

N° d'ordre : 54

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Pierre BOLOMEY

Ingénieur-Agronome

1^{re} THÈSE - LE GLUTATHION ET L'INHIBITION DE LA
FERMENTATION ALCOOLIQUE PAR LES
ACIDES ACETIQUES MONOHALOGÉNÉS.

2^e THÈSE - PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTE.

Soutenues le **13 JUIN 1939** devant la Commission d'examen

MM. JAVILLIER *Président*
COMBES } *Examineurs.*
AUBEL }

G A P

IMPRIMERIE LOUIS-JEAN

6, Avenue de Provence, 6

1939

N° d'ordre : 54

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Pierre BOLOMEY

Ingénieur-Agronome

1^{re} THÈSE - LE GLUTATHION ET L'INHIBITION DE LA
FERMENTATION ALCOOLIQUE PAR LES
ACIDES ACETIQUES MONOHALOGÉNÉS.

2^e THÈSE - PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTE.

Soutenues le

devant la Commission d'examen

MM. JAVILLIER *Président*

COMBES
AUBEL } *Examineurs.*

G A P

IMPRIMERIE LOUIS-JEAN

6, Avenue de Provence, 6

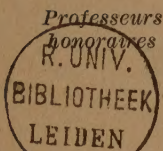
1939

Faculté des Sciences de l'Université de Paris

MM.

Doyen honoraire .. M. MOLLIARD.

Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du Globe.



H. LEBESQUE.
Emile PICARD.
Léon BRILLOUIN.
GUILLET.
PÉCHARD.
FREUNDLER.
AUGER.
BLAISE

DANGEARD.
LESPIEAU.
MARCHIS.
VESSIOT.
PORTIER.
MOLLIARD.
LAPICQUE.
G. BERTRAND.

ABRAHAM.
Ch. FABRY.
Léon BERTRAND.
WINTREBERT.
DUBOSQ.
BOHN.
RABAUD.

PROFESSEURS

M. CAULLERY ..	T Zoologie (Evolution des êtres organisés).	DE BROGLIE ...	T Théories physiques.
Emile BOREL ..	T Calcul des probabilités et Physique mathématique.	CHRÉTIEN	Optique appliquée.
Jean PERRIN ..	T Chimie physique.	P. JOB	Chimie générale.
E. CARTAN	T Géométrie supérieure.	LABROUSTE	Physique du Globe.
A. COTTON	T Recherches physiques.	PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées.
J. DRACH	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	VILLEY	Mécanique physique et expérimentale.
Charles PÉREZ .	T Zoologie.	COMBES	T Physiologie végétale.
M. GUICHARD ..	T Analyse et mesures chimiques.	GARNIER	T Mathématiques générales.
Paul MONTEL ..	T Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	PÉRÈS	Mécanique théorique des fluides.
L. BLARINGHEM .	T Botanique.	HACKSPILL	T Chimie minérale.
G. JULIA	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	LAUGIER	T Physiologie générale.
C. MAUGUIN ...	T Minéralogie.	TOUSSAINT	Technique Aéronautique.
A. MICHEL-LÉVY	T Pétrographie.	M. CURIE	Physique (P. C. B.).
	Mécanique expérimentale des fluides.	G. RIBAUD	T Hautes températures.
A. DENJOY	T Application de l'analyse à la Géométrie.	CHAZY	T Mécanique rationnelle.
L. LUTAUD	T Géographie physique et géologie dynamique.	GAULT	Chimie (P. C. B.).
Eugène BLOCH .	T Physique.	CROZE	Recherches physiques.
G. BRUHAT	T Physique théorique et physique céleste.	DUPONT	T Théories chimiques.
E. DARMOIS ...	T Enseignement de Physique.	LANQUINE	T Géologie structurale et Géologie appliquée.
A. DEBIERNE ..	T Physique Générale et Radioactivité.	VALIRON	Mathématiques générales.
A. DUFOUR	T Physique (P. C. B.).	BARRABÉ	Géologie structurale et géologie appliquée.
L. DUNOYER ..	Optique appliquée.	MILLOT	Biologie animale (P. C. B.).
A. GUILLIERMOND	T Botanique.	F. PERRIN	Théories physiques.
M. JAVILLIER ..	T Chimie biologique.	VAVON	Chimie organique.
ROBERT-LÉVY ..	T Physiologie comparée.	G. DARMOIS ...	Calcul des probabilités et Physique-Mathématique.
F. PICARD	Zoologie (Evolution des êtres organisés).	CHATTON	T Biologie maritime.
Henri VILLAT ..	T Mécanique des fluides et applications.	AUBEL	Chimie biologique.
Ch. JACOB	T Géologie.	Jacq. BOURCART	Géographie physique et Géologie dynamique.
P. PASCAL	T Chimie générale.	M ^{me} JOLIO-CURIE.	Physique générale et Radioactivité.
M. FRÉCHET ...	T Calcul différentiel et Calcul intégral.	PLANTEFOL	Biologie végétale (P. C. B.).
E. ESCLANGON ..	T Astronomie.	CABANNES	Enseignement de Physique.
M ^{me} RAMART-LUCAS	T Chimie organique.	GRASSÉ	Biologie animale (P. C. B.).
H. BÉGHIN	T Mécanique physique et expérimentale.	PRÉVOST	Chimie (P. C. B.).
FOCH	Mécanique expérimentale des fluides.	BOULIGAND	Mathématiques.
PAUTHENIER ...	Physique (P. C. B.).		

Secrétaire A. PACAUD.

Secrétaire honoraire .. D. TOMBECK.

A LA MÉMOIRE DE MON REGRETTÉ MAÎTRE M. SCHOEN

Professeur à l'Institut Pasteur
Chef du Service des Fermentations à l'Institut Pasteur
Professeur à l'Institut National
des Industries de Fermentation de Bruxelles

qui m'a offert une bienveillante hospitalité dans son laboratoire et m'a initié à la science pastoriennne.

Je garderai vivant dans mon esprit le souvenir de ce maître admiré et respecté qui savait si bien faire aimer la science.

A Monsieur G. BERTRAND

*Professeur honoraire à la Faculté des Sciences
Chef de Service à l'Institut Pasteur
Membre de l'Académie des Sciences,
de l'Académie de Médecine et de l'Académie d'Agriculture*

Hommage très respectueux.

A Monsieur JAVILLIER

*Professeur à la Faculté des Sciences
Professeur au Conservatoire des Arts-et-Métiers
Membre de l'Académie des Sciences
et de l'Académie d'Agriculture*

Témoignage de mes sentiments dévoués.

A Monsieur E. AUBEL

Professeur à la Faculté des Sciences

Témoignage de ma profonde gratitude
pour ses précieux conseils.

A Messieurs P. BERAUD et P. BRECHOT

Assistants à l'Institut Pasteur

qui ont été pour moi des amis et d'excellents conseillers.

A mon Père

INTRODUCTION

On connaît depuis longtemps l'action antiseptique des acides acétiques monohalogénés sur les fermentations bactériennes et la glycolyse musculaire.

Lundsgaard (1930) a cru pouvoir séparer au moyen de ces substances, le métabolisme respiratoire du métabolisme fermentatif.

Le mécanisme de l'action antiseptique de ces acides halogénés, étudié par de nombreux auteurs, a été finalement attribué à leur éventuelle réaction avec le glutathion ou autres composés sulfhydrilés intracellulaires.

L'objet de notre travail sera d'étudier l'action inhibitrice des acides monohalogénés sur la fermentation alcoolique, en relation avec le glutathion contenu dans les levures.

PREMIERE PARTIE

REVUE DES TRAVAUX ANTERIEURS

I

ANTISEPTIQUES ET ACCOUTUMANCE

Dans le *Traité de Microbiologie* de Duclaux, on peut trouver les premières études cohérentes sur les antiseptiques des fermentations (1). Duclaux leur consacre un chapitre spécial, en appliquant des notions quantitatives à leur étude. Nous y voyons ainsi que l'action des antiseptiques est variable et dépend de nombreux facteurs. Il leur donne la définition très généralisée suivante : « Nous appellerons antiseptique toute substance dont l'intervention sous une forme quelconque, dans une fermentation, modifie la marche du phénomène. »

Désormais l'étude des antiseptiques aura sa place dans tous les *Traités de Microbiologie* (2).

On ne connaît pas encore le mécanisme de leur action mais on constate déjà de nombreuses différences dans leur effet sur les microorganismes.

Miquel et Cambier (3) séparent les « substances infertilisantes » qui ne font que suspendre la vie des bactéries dans les milieux de culture, des « substances stérilisantes » qui détruisent radicalement la vie des bactéries.

Les bactériologistes distinguent aussi pour une même substance déterminée « le pouvoir infertilisant » du « pouvoir antiseptique », qui sont fonction de sa concentration.

La liste des antiseptiques s'est allongée énormément par la suite et de nombreux auteurs se sont efforcés de leur imposer une classification.

Dernièrement, Genevois (4) a essayé un classement des substances qui arrêtent un phénomène biologique déterminé par une cellule vivante. Il les répartit dans les trois groupes suivants : les narcotiques qui exercent une action réversible arrêtant tous les phénomènes biologiques en même temps; les antiseptiques exerçant une action irréversible par la mort de la cellule; et les inhibiteurs spécifiques d'un seul processus biologique.

En général, les microorganismes mis au contact des antiseptiques subissent certains changements qu'il sera utile d'étudier pour mieux pénétrer le mode d'action de ces substances.

Les cellules vivantes finissent par s'habituer à l'antiseptique mis à leur contact, phénomène étudié par Duclaux dans son *Traité* et appelé par lui « accoutumance » (5). Les premiers essais d'accoutumance ont été faits par Kossiakoff (6) dans le laboratoire de Duclaux, mais les travaux les plus classiques et les plus riches en résultats, sont certainement ceux d'Effront (*) sur l'accoutumance des levu-

(*) Les travaux d'Effront auxquels il est fait allusion ici ont été publiés dans les *C. R. Ac. Sciences* et le *Moniteur Scientifique* entre les années 1890 et 1894.

res aux fluorures. Effront (7) termine ses très intéressantes recherches sur ce sujet, en définissant avec précision le mécanisme de résistance de la levure aux fluorures. « L'acclimatation résultera uniquement du développement de la propriété déjà préexistante mais avec moins d'intensité, de puiser la substance minérale de la solution ambiante et en même temps de l'augmentation de l'affinité de la cellule pour la chaux ». En poussant ses études « d'acclimatation » à l'aldéhyde formique, Effront (7) esquisse une loi générale d'acclimatation qui réside suivant lui dans le développement d'une fonction spéciale qui amène des changements dans la sensibilité des cellules envers les antiseptiques.

Il arrive à peu près à la même conclusion après l'étude de l'accoutumance de la levure de bière à l'arsenic (8), la levure acclimatée pouvant produire SH_2 qui neutralise l'arsenic par réduction. Mais il est aussi d'avis que l'accoutumance se ferait par sélection des cellules de levure.

Nous devons à Richet et ses collaborateurs de nombreuses études physiologiques sur l'accoutumance des ferments lactiques à diverses substances toxiques ou non toxiques.

Richet, Bachrach et Cardot (9) montrent que l'action d'un sel toxique, sur le ferment lactique, ne provoque pas seulement l'accoutumance mais aussi un phénomène d'anaphylaxie, qui, selon les auteurs, « est une sensibilité accrue pour un poison, grâce à une petite dose antérieure de ce même poison ».

Les phases d'anaphylaxie et d'accoutumance sont successives, mais variables comme durée. D'après les mêmes auteurs (10), l'accoutumance est spécifique pour un seul poison, mais les cellules microbiennes mises en présence de deux poisons à la fois, peuvent s'accoutumer simultanément à chacune de ces deux substances toxiques.

Par contre, si on alterne la culture du ferment sur les deux substances, l'accoutumance se produira à un degré plus faible que si l'action des toxiques était continue.

Enfin (11) la même cellule de microorganisme peut acquérir simultanément l'accoutumance pour le $\text{As O}_4 \text{ K}_3$ et l'aptitude contraire qui est l'anaphylaxie pour le $\text{Cl}_2 \text{ Hg}$ ou $\text{SO}_4 \text{ Cu}$.

Cardot et Laugier (12) étudient le comportement des ferments en présence de très fortes concentrations de substances non toxiques par elles-mêmes : le KCl et le glycérol. Il y a une accoutumance certaine avec transmission à de nombreuses générations descendantes, des nouveaux caractères physiologiques acquis. Pourtant, dans un milieu de culture ordinaire, ces races accoutumées sont rapidement éliminées par les races normales.

Ces mêmes auteurs (13) montrent que la spécificité de l'accoutumance est loin d'être une règle générale.

Plus récemment, Pett (14) nous offre le cas d'accoutumance des levures aux cyanures en nous décrivant un changement important dans les cellules accoutumées.

Elles présentent d'abord une augmentation de leur taux de flavines, puis la disparition de celles-ci et l'apparition d'un nouveau pigment bleuâtre.

Voici donc la voie tracée par Duclaux et Effront qui paraît être la bonne dans la recherche de l'action d'un antiseptique; on pourrait ainsi, grâce à l'effet connu de l'antiseptique, pénétrer le mécanisme intime d'un processus vital quelconque.

II

ACTION DES ACIDES MONOHALOGÉNÉS
SUR LA DÉGRADATION GLUCIDIQUE

Les acides halogénés sur lesquels ont porté les travaux que nous passons en revue sont : l'acide monoiodacétique $\text{CH}_2\text{I COOH}$, l'acide monobromacétique $\text{CH}_2\text{Br COOH}$ et l'acide monochloracétique $\text{CH}_2\text{Cl COOH}$.

Les premières connaissances sur le rôle antiseptique de ces substances nous viennent de Pohl (15), qui découvre l'action empoisonnante du monobromacétate de Na sur les grenouilles vivantes. Dans leurs études sur l'action comparée d'un grand nombre d'acides sur la fermentation alcoolique, Rosenblatt et Rosenband (16) remarquent l'action énergique de l'acide monochloracétique, dont la concentration limite, capable d'arrêter la fermentation, est M/50, concentration plus petite que celle de tous les autres acides étudiés.

Schwartz et Oschmann (17) reprennent les investigations de Pohl et découvrent que l'acide monobromacétique arrête la production de l'acide lactique pendant la contraction musculaire.

Mais ces travaux seraient peut-être restés dans l'ombre sans ceux de Lundsgaard qui ont mis définitivement les acides monohalogénés à l'ordre du jour. Le muscle strié empoisonné par l'acide monoiodacétique continue à se con-

tracter mais ne produit plus d'acide lactique (18); l'interprétation de ce phénomène, donnée par Lundsgaard, étant en dehors de notre sujet, nous la passerons sous silence. Ce qui nous intéresse ici c'est l'action spécifique de notre acide, qui arrête la glycolyse musculaire sans nuire à la contraction. Passant de la glycolyse à la fermentation alcoolique, Lundsgaard trouve qu'une concentration M/1.000 d'acide iodacétique arrête complètement la fermentation par une levure vivante (19).

Il obtient des résultats intéressants avec la zymase de levure sèche; il constate d'abord que l'action de l'acide iodacétique n'est pas instantanée; elle nécessite, en effet, un certain temps pour exercer son pouvoir maximum, et la zymase ainsi empoisonnée ne produit plus d'hexose-phosphate (19). Se basant sur ce premier résultat et avec l'aide de l'acide iodacétique, Lundsgaard cherche à éclaircir l'hypothèse de Pfeffer et Pflüger à laquelle du reste il ne croit pas, suivant laquelle l'oxydation ne serait que la suite d'une première désagrégation d'origine fermentaire. Les recherches qu'il entreprit dans ces directions, lui permirent d'affirmer que grâce à l'acide iodacétique qui a un effet inhibant spécifique sur le processus de fermentation sans toucher à celui de la respiration, il est possible de séparer ces deux modes de désagrégation glucidique en leur attribuant à chacun leur propre voie indépendante l'une de l'autre.

Ces conceptions exprimées par Lundsgaard ont déclenché un essaim de travaux, qui se sont efforcés de les vérifier et de déterminer l'endroit où les acides halogénés agissent sur la chaîne des dégradations glucidiques. Nous verrons par la suite que les résultats de ces recherches sont souvent contradictoires et que le problème s'en est trouvé plutôt compliqué.

Parmi les auteurs ayant pleinement confirmé les résultats obtenus par Lundsgaard, nous devons citer Genevois et Cayrol, qui travaillent surtout avec l'acide monobromacétique, réussissent à inhiber la fermentation avec une concentration M/10.000 sans toucher à la respiration ni à la croissance des levures (20).

Suivant Yamasaki (21), la fermentation des hexoses-diphosphates en présence d'acide iodacétique est possible, ce qui confirme ainsi l'hypothèse de Lundsgaard, qui situe l'action de l'acide halogéné au niveau de la phosphatase.

Telle ne sera pas l'opinion de Mac Farlane (22), auteur ayant préparé une phosphatase de levure normalement incapable d'estérifier ou de fermenter, mais qui, en présence d'acide iodacétique, ne peut même plus hydrolyser les hexoses-diphosphates. A l'appui de ces premiers résultats, l'accélération de la fermentation par les jus de pression de levure, provoquée par les arsénates, est inhibée par l'iodacétate de K.

Un des premiers ayant vu, contrairement à Lundsgaard, que l'acide halogéné peut arrêter les deux processus de dégradation des glucides, anaérobie et aérobie, a été Krebs (23), qui, avec une concentration M/3.000 arrête, en même temps, la respiration et la glycolyse dans les tissus organiques.

Des travaux de R. Nilsson, Zeile et Euler (24), il ressort qu'on peut en effet, avec des doses assez fortes d'acide halogéné, arrêter en même temps la fermentation et la respiration, et que la réduction du bleu de méthylène subit une influence identique à celle de la respiration sans être touchée par les doses qui arrêtent la fermentation seule.

Ces faits, opposés aux premières constatations de Lundsgaard, ont finalement été admis par presque tous les au-

teurs. Pour situer le moment de l'attaque des acides halogénés, une des premières idées qui viennent à l'esprit est de se rendre compte de la manière dont se comportent les produits intermédiaires des fermentations, au contact de ces antiseptiques.

Boysen Jensen (25) a apporté quelques éclaircissements, en montrant que la fermentation de la dioxyacétone par le *Schizosaccharomyces Ludwigii* et de l'acide pyruvique par la levure pressée, est moins inhibées par l'acide iodacétique que la fermentation du glucose par les mêmes ferments. Il confirme l'observation des auteurs précédents, concernant l'action de l'acide iodacétique sur la réduction du bleu de méthylène.

Lohmann (26) établit un taux d'inhibition de la formation d'acide lactique par le muscle empoisonné, taux allant en croissant depuis le méthylglyoxal synthétique, en passant par l'hexose-diphosphate, jusqu'au glycogène. C'est du reste cette généralité de l'inhibition sur toutes les étapes de la dégradation glucidique qui lui fait croire à une action directe de l'acide halogéné sur le complexe diastasique même et non seulement sur le co-ferment, opinion qui venait d'être lancée.

Barrenscheen et Braun (27) obtiennent une accumulation de méthylglyoxal à partir d'une glycolyse par les tissus organiques empoisonnés, ce qui leur fait croire à une action de l'acide iodacétique sur la co-diastase de la glyoxalase, co-diastase très mal connue par eux. Nous verrons par la suite que cette opinion émise sans assise solide a été reprise pour le glutathion.

Mais c'est surtout Dudley (28) qui prouve sans contestation que l'iodacétate de Na est un puissant inhibiteur de la glyoxalase qui transforme le méthylglyoxal en acide lac-

tique ainsi que de la phénylglyoxalase, et croît ainsi expliquer le rôle antiseptique de cet acide par son action sur la co-diaстase de la céto-aldéhydomutase.

Lundsgaard (29) lui-même, s'est vu obligé de refaire certaines expériences avec des méthodes plus minutieuses, qui lui permirent de donner quelques conclusions tout à fait exactes. C'est ainsi qu'il a étudié l'influence du pH sur l'empoisonnement des levures par l'acide iodacétique, en constatant que l'inhibition est fortement diminuée par l'augmentation du pH, qu'à un pH faible, la respiration est également touchée et qu'il existe une zone assez petite entre pH 4,5 et 5 où la séparation entre la dégradation anaérobie et la dégradation aérobie est totale. Pourtant il est obligé d'admettre que l'oxydation des produits finals de la fermentation, comme l'alcool et les produits intermédiaires, comme l'acide succinique, est moins influencée par nos acides. Par contre il est d'avis que la synthèse des sucres à partir de l'alcool ne peut être faite par les levures empoisonnées.

Certains de ces derniers résultats de Lundsgaard sont confirmés et, on pourrait le dire, amplifiés par Ehrenfest (30) et par les recherches physiologiques de Meyerhof et Boyland (31) de Quastel et Wheatley (32).

Ehrenfest ayant étudié minutieusement à l'aide de la méthode manométrique de Warburg, la manière d'agir de l'iodacétate, a retrouvé l'influence du pH et l'explique par une modification de la perméabilité de la cellule. Les levures empoisonnées ne peuvent plus oxyder le glucose, mais peuvent encore oxyder les lactates, pyruvates et alcools, à un degré plus faible toutefois que ne le font les levures normales.

D'après Meyerhof et Boyland l'empoisonnement total du

muscle par l'acide halogéné, qui est une réaction de temps, dépend de la pénétration de l'acide dans les cellules du tissu ; le muscle empoisonné peut très bien brûler des lactates (*d* — seulement) ajoutés mais non les synthétiser en sucre, et si normalement il ne brûle pas d'acide lactique, c'est simplement que l'inhibition de la glycolyse l'en prive complètement.

Suivant Quastel et Wheatley un tissu cérébral empoisonné par l'acide iodacétique à une concentration M/4.000 inhibe complètement l'oxydation du glucose, du fructose et du mannose, moins l'oxydation des lactates, pyruvates et glutamates et pas du tout celle des succinates.

Des investigations plus minutieuses ont permis de connaître un certain nombre de réactions caractéristiques du métabolisme glucidique qui sont inhibées par les acides halogénés.

Des recherches de Embden et Deuticke (33) prouvent que l'inhibition par les acides halogénés consiste dans l'empêchement des processus d'oxydo-réduction qui ont lieu dans la chaîne des dégradations glucidiques. En effet, l'acide monobromacétique empêche la transformation des hexoses-diphosphates en acide phosphoglycérique et la réduction de l'acide pyruvique en acide lactique ; par contre il laisse inchangée la disjonction de l'acide phosphoglycérique en acide pyruvique et phosphorique.

Dans le même sens Meyerhof O., Ohlmeyer P., et Möhle W. (34) montrent que l'acide iodacétique arrête la réaction couplée d'oxydo-réduction et de phosphorylation :

ac. aldéhydeglycérophosphorique + cozymase + adénosine diphosphorique + 1 ac. phosphorique = ac. glycé-

rophosphorique + dihydrocozymase + 1 adénosinetriphosphorique.

ainsi que la réaction :

acétaldéhyde + dihydrocozymase = alcool éthyl. + cozymase.

Ce sont les réactions 13 et 21 du tableau que Parnas donne dans un récent travail où il énumère toutes les réactions connues du métabolisme glucidique (35).

On connaît maintenant certaines enzymes bien définies dont l'action est certainement entravée par l'acide iodacétique. Ce sont : la déshydrase succinique (36) et les mutases de Green, Needham et Dewan (37).

L'influence de l'acide monohalogéné sur la fermentation aérobie, la fermentation anaérobie et la respiration, semble avoir été définitivement élucidée par Hoogerheide (38). On connaît sa théorie suivant laquelle « la fermentation aérobie doit être interprétée comme le surplus des produits de dégradation, produits que la respiration ne peut pas brûler, la capacité du ferment respiratoire de Warburg qui catalyse l'oxygène étant insuffisante ».

A la lumière de cette hypothèse vérifiée par de belles expériences, Hoogerheide conclut que l'action de l'acide ne serait pas du tout spécifique mais se ferait sentir d'abord sur la fermentation aérobie et au moment où celle-ci est presque nulle, cet acide agirait aussi sur la respiration (tableau I) (*).

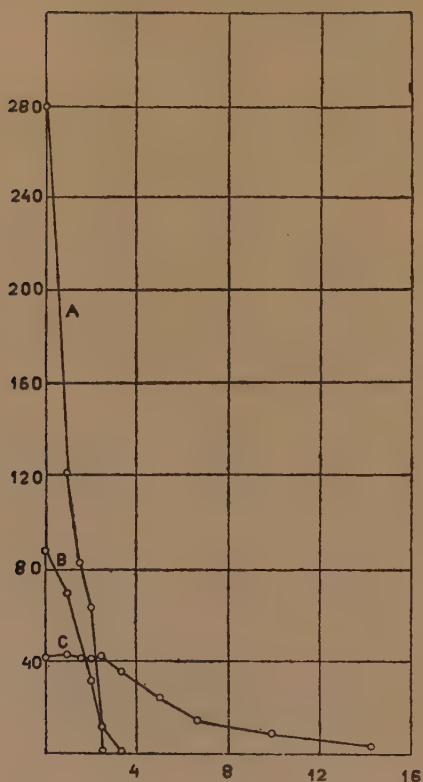
Influence des quantités croissantes d'acide monoiodacétique sur la respiration (C), la fermentation aérobie (B) et la fermentation anaérobie (A) de la levure pressée.

En ordonnée : sucre consommé en millimol $\times 22 \times 10,6$; en abscisse :

mg. d'acide monoiodacétique par 100 cc.

(*) *Ann. des Ferm.*, t. 1, 1935, p. 385 (Hoogerheide).

Tableau I



En effet, avec les levures ayant un très fort pouvoir respiratoire, les premières traces d'acide iodacétique agissent déjà sur leur respiration.

En dehors des acides acétiques monohalogénés, il existe aussi d'autres composés halogénés ayant une forte action inhibitrice sur les fermentations. Nous devons à Simon (39) et à Cayrol (40) une étude comparative de ces divers corps.

L'acide monobromacétique ou certains esters de cet acide avec le glycérol, l'éthanol, l'éthoxyglycol, le méthoxyglycol,

etc... sont aujourd'hui souvent utilisés par les fraudeurs pour la conservation des matières alimentaires.

*
**

La réaction *in vitro* des acides halogénés avec les composés thiolés a été étudiée en détail et décrite par Bersin (41) et Hellström (42).

Barrenschéen et Beneschovsky (43) relient l'effet antiseptique des acides halogénés à leur action sur le glutathion. D'après eux le glutathion favorise la transformation de l'acide pyruvique en acide lactique, et le taux du glutathion réduit, dans un muscle de grenouille empoisonné par l'acide iodacétique ou par d'autres poisons, est considérablement diminué.

C'est Lohmann, le premier, qui établit le rôle du glutathion dans une réaction diastasique bien définie (44). Le glutathion réduit est le co-ferment spécifique — agissant en dehors des métaux lourds — de la cétoaldéhydo-mutase qui transforme le méthylglyoxal de synthèse en acide lactique et de celle qui transforme le phénylglyoxal en acide ménélique.

Par contre le coferment issu du système catalytique musculaire, qui favorise la glycogénolyse n'a aucune influence sur la méthylglyoxalase (45).

Voici maintenant les preuves les plus connues et les plus sérieuses qui ont été mises en avant pour démontrer que le mécanisme de l'arrêt de la dégradation glucidique par les acides monohalogénés consiste dans leur action sur les composés thiolés.

Les expériences de Dickens (46) ont porté sur l'activité de la glyoxalase du foie, soit dans des extraits dialysés et

non dialysés, soit dans les tissus entiers. L'extrait rendu inactif par dialyse est réactivé par le glutathion réduit à une concentration de M/10.000 environ puis à nouveau inactivé par une quantité d'iodacétate, équivalente au glutathion ajouté. De même le tissu entier inactivé par l'iodacétate, retrouve son activité normale par addition d'une quantité équivalente ou même légèrement moindre de glutathion réduit.

La réactivité du glutathion avec les acides halogénés *in vitro*, étudiée aussi par Dickens, varie avec les différents halogènes dans l'ordre et les proportions suivantes: I — 15; Br — 9; Cl — 0,15. La réaction du glutathion ainsi que celle de la cystéine avec les iodacétates est bimoléculaire d'après la formule :



Le thioéther qui correspond à la cystéine, soit : $HOOC.CH(NH_2)CH_2SCH_2COOH$, a été préparé par l'auteur à l'état pur dans des conditions semblables aux conditions physiologiques.

Les travaux de Girsavičius (47), de Platt et Schroeder (48) ont mis en évidence certains rapports existant entre l'activité de la glyoxalase et la présence du glutathion. Platt et Schroeder en accord avec Jowett et Quastel (49), expliquent le rôle du glutathion par sa réaction avec le substrat, le méthylglyoxal :



Ces mêmes auteurs prétendent avoir réactivé une levure traitée à l'acétone dont l'activité avait été inhibée par l'iodacétate, en lui ajoutant du glutathion.

Quastel (50), qui est aussi l'un des promoteurs de l'interaction des composés thiolés et des acides halogénés, éta-

blit ses conclusions en se basant sur des expériences concernant la toxicité de l'acide monoiodacétique injecté à des animaux et son effet inhibant sur l'oxydation du glucose par le tissu cérébral. Ces deux phénomènes sont diminués ou même annihilés par une addition équimoléculaire de thiosulfate, de cystéine ou de glutathion.

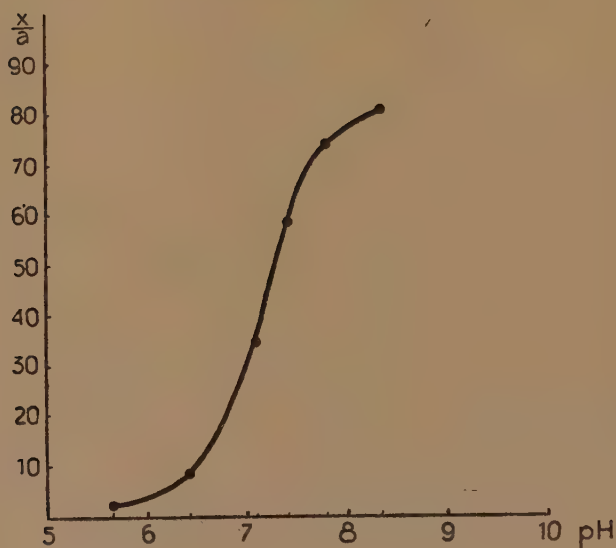
Des mesures iodométriques prouvent que la réaction entre les deux substances s'opère molécule à molécule.

Puisque l'effet toxique des acides halogénés est dû à leur faculté de se combiner avec les composés thiolés de l'organisme, il en résulte, pense l'auteur, que ces derniers, et surtout le glutathion qui en est la forme couramment répandue chez les êtres vivants, doivent jouer un rôle important dans la dégradation glucidique.

Une étude systématique de cette réaction a été faite par Rapkine (51) qui a établi la vitesse de la réaction à différentes températures et à pH variable (tableau II) (*) ainsi que l'influence de ces deux facteurs sur la vitesse initiale de la réaction.

(*) *Ann. des Ferm.*, t. 2, 1936, p. 552 (Rapkine).

Tableau II



Dans les limites de température et de pH étudiées et les conditions envisagées, la vitesse croît avec la température et le pH. Le titrage par une solution décimale de soude de l'acide iodacétique dégagé montre que l'on est en présence d'une réaction bimoléculaire, réaction conforme à l'opinion des autres auteurs. « L'acide monoiodacétique se combine également aux groupements —SH fixes liés aux protéines dénaturées réduites (extraits du blanc d'œuf d'oursin) avec libération d'une molécule de HI pour chaque molécule d'acide monoiodacétique et de —SH lié. » (52). On peut même, de cette manière, doser les groupements —SH liés aux protéines.

Au cours de l'étude de la cinétique de la réaction entre l'acide iodacétique et les groupements SH fixes, l'auteur n'a pu aboutir à un résultat précis. Toutefois, cette étude

montre que les protéines réduites réagissent beaucoup plus lentement avec cet acide que ne le fait le glutathion.

Rapkin, qui avait déjà montré dans un travail antérieur (43) que le développement de l'œuf d'oursin était accompagné d'une augmentation de glutathion réduit, pense qu'au moins une des actions de l'acide monoiodacétique sur les processus biologiques est de se combiner avec les groupements $-SH$ liés ou fixés aux protéines, en les rendant inactifs.

C'est ce même auteur qui a étudié l'influence de l'acide iodacétique sur la levure *Schizosaccharomyces Pombe* (54). Il est d'avis que l'influence du pH sur l'effet toxique est due à son action sur la vitesse de pénétration de l'antiseptique à l'intérieur de la cellule, car le suc de Lebedeff à pH 6,8 perd son pouvoir de fermentation aussi rapidement que la levure à pH 4,6. Une solution de glutathion mise en contact avec des levures dont la croissance avait été arrêtée par l'acide iodacétique, accélère très nettement la réactivation de la croissance, réactivation qui a déjà lieu si les levures ainsi traitées sont mises dans un moût normal exempt d'acide. Le fait est important car c'est un des rares exemples de réversibilité de l'inhibition due au glutathion. Pourtant il faut noter une observation curieuse de Genevois et Cayrol (55) qui remarquent que le complexe acide bromacétique + excès de cystéine est plus actif et que le mélange équimoléculaire est aussi actif que l'acide bromacétique seul.

Ce sont Schroeder, Woodward et Platt les premiers, qui ont étudié le parallélisme entre l'inhibition par des acides halogénés et la variation du taux du glutathion dans les levures. En effet l'inhibition entraîne une diminution appréciable du glutathion, les deux phénomènes sont des réac-

tions de temps, les deux ont la même sensibilité envers le pH. Mais là où les résultats viennent contredire l'hypothèse, c'est lorsque l'inhibition totale par l'acide iodacétique est parallèle à une perte de 30 % du glutathion, alors qu'une concentration plus faible d'iodure provoque une disparition de 75 % de glutathion en n'inhibant que légèrement la fermentation (56).

Voici encore des expériences absolument contradictoires qui témoignent de la difficulté de tirer, jusqu'à présent du moins, une conclusion nette de cette discussion.

Meyerhof et Kiessling (57), en faisant agir sur du glucose activé par l'hexokinase (58), un extrait musculaire dialysé, donc sans co-diastase, et auquel on adjoint de l'adénylpyrophosphate additionné de Mg, obtiennent de l'acide lactique; par contre, en ajoutant du glutathion, le résultat est nul. C'est ce qui prouve le rôle co-diastasique de l'adénylpyrophosphate de Mg et l'inertie du glutathion dans ce cas. Tout à fait opposées à ce résultat, donc en faveur du rôle du glutathion, sont les expériences de Gaddie et Stewart (59) qui prouvent que le glutathion ajouté à l'extrait dialysé, avec le Mg seul ou avec la totalité du complexe co-diastasique, favorise nettement la production de l'acide lactique aux dépens du glycogène. D'après ces auteurs, le glutathion interviendrait comme activateur dans la réaction d'Emden-Meyerhof où l'acide lactique prend naissance à la suite d'une oxydo-réduction intermoléculaire entre l'acide pyruvique et l'acide glycérophosphorique, suivie d'une déphosphorylisation.

Tous les composés thiolés n'agissent pas avec la même vitesse sur les acides halogénés. Un travail concernant ce problème a été exécuté par Smythe (60) qui classe les thiols étudiés par lui, par ordre de réactivité décroissante : thio-

glucose, acide thiosalicylique, cystéine, glutathion et thio-glycol.

Dans chaque cas la réaction est plus rapide avec l'iodacétamide qu'avec l'iodacétate. Cependant, l'inhibition de la fermentation de la levure et du suc de Lebedeff est beaucoup plus forte avec l'iodacétate qu'avec l'iodacétamide. L'auteur en conclut que la réaction inhibitrice pourrait être autre que la réaction entre le corps halogéné et le composé thiolé.

*
**

Il existe des travaux confirmant l'hypothèse jusqu'ici envisagée sur le mécanisme de l'inhibition par les acides halogénés, ainsi que d'autres hypothèses toutes différentes relatives à l'action de ces acides.

Lohmann (61) a vu que l'inhibition par l'acide iodacétique de la formation de l'acide lactique à partir du glycogène, a lieu même sur un extrait musculaire dialysé, totalement dépourvu de glutathion. Comme d'un autre côté il ne réussit pas à réactiver, par une addition du tripeptide, la glycolyse empoisonnée, il tire la conclusion que l'inhibition est indépendante du glutathion.

Lohmann admet volontiers qu'il y ait une réaction entre l'acide halogéné et le thiol déjà existant, ou ajouté au milieu; dans ce dernier cas il se formerait le thioéther inactif, qui détournerait ainsi une partie de l'acide de son rôle empoisonnant.

Une réaction très importante des acides monohalogénés ayant lieu sur les amines a été décrite par Neuberg et Kobel (62). Ils expliquent la perte du pouvoir inhibant de ces acides, par leur faculté de se combiner avec les amines,

conduisant probablement à des composés inactifs. L'étude comparative et détaillée des réactions des composés monohalogénés avec les mercaptans et les amines est due à Michaelis et Schubert (63). La réaction avec les amines aussi bien aromatiques qu'aliphatiques et spécialement avec les acides aminés, a lieu plus lentement qu'avec les thiols, et à un pH légèrement plus élevé, supérieur à 8; chaque atome d'hydrogène est susceptible d'être remplacé par le radical $\text{—CH}_2\text{COOH}$, donnant ainsi des produits polycarboxylés. Parmi ces derniers un grand nombre ont été préparés par les auteurs. Les amines, contrairement aux thiols, réagissent plus vite avec l'acide iodacétique qu'avec l'iodacétamide.

Le renversement par les amines, de l'inhibition de la fermentation alcoolique par l'acide monoiodacétique, qu'avaient cru découvrir des auteurs viennois (64), est simplement due à l'alcalinité de ces dernières; car on sait qu'en milieu alcalin, l'action inhibitrice de l'acide iodacétique est plus faible qu'en milieu acide (65).

Il est définitivement acquis que, *in vitro*, il y a une réaction entre les acides monohalogénés et les composés thiolés, réaction trouvée souvent même *in vivo*. Si la toxicité de ces substances réside dans ce fait, il reste à se demander pourquoi l'élimination sous une forme quelconque du glutathion ou autre thiol, entraînerait l'arrêt du métabolisme glucidique.

Le glutathion a-t-il vraiment un rôle tellement important dans les processus de dégradation glucidique?

III

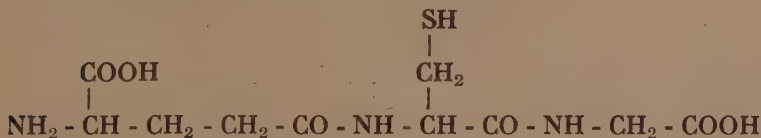
LE GLUTATHION :
QUELQUES PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES
GÉNÉRALES

Le glutathion a été isolé pour la première fois par Hopkins en 1921 (66) à partir de la levure, du foie et du muscle des mammifères. C'est toujours Hopkins qui, en 1929 (67) a précisé la nature chimique et la composition du glutathion : c'est un tripeptide formé par l'acide glutamique, la cystéine et le glycocolle.

L'ordre de ces acides aminés dans la molécule du glutathion a été établi à la suite de nombreux travaux, parmi lesquels ceux de Nicolet (68).

Enfin, plus récemment, Harington et Mead (69) ont réussi la synthèse du glutathion en confirmant l'exactitude de sa formule, déterminée par l'analyse.

Voici la formule développée du glutathion qui est la glutamyl-cystényl-glycine : $C_{10}H_{17}N_3SO_6$



Dès la découverte du glutathion, Hopkins (66) a commencé son étude physiologique. Des fragments de certains tissus animaux peuvent, *in vitro*, soit réduire le glutathion oxydé, soit oxyder le glutathion réduit, même en anaéro-

biose : l'apparition d'une forme se faisant toujours aux dépens de l'autre.

La forme réduite, GSH peut réduire légèrement le bleu de méthylène.

Par contre, ces deux formes accélèrent sensiblement la réduction de ce corps par des tissus partiellement lavés. Hopkins en conclut que le glutathion doit jouer dans l'organisme vivant le rôle de transporteur d'H grâce au mécanisme strictement réversible suivant :



Cette faculté de transporter l'H s'appuie sur la grande facilité avec laquelle ce corps est réductible et autoxydable.

Pourtant ces affirmations de Hopkins trouvèrent de nombreux contradicteurs. Ce sont surtout Warburg et Sakuma (70) qui montrent que l'autoxydation des composés sulfhydrylés serait due à la présence de Fe.

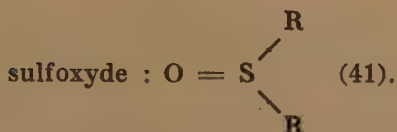
En effet, des traces de fer ajoutées à ces substances purifiées accélèrent leur autoxydation. Selon Harrison (71) la non autoxydabilité des composés thiolés n'est pas absolue, bien que la catalyse par les métaux lourds soit certaine. Cet auteur propose un schéma de l'autoxydation, où il fait intervenir l'action catalytique du Fe.

Meldrum et Dixon (72) sont d'avis que le pouvoir d'autoxydation du glutathion dépend de la présence simultanée de métaux catalytiques et d'une substance mal définie, existant dans les impuretés du glutathion. Cette substance formerait un complexe catalytique actif avec les métaux.

Enfin, Dixon et Tunnicliffe (73) après avoir montré que la présence de la forme oxydée accélère la réduction du bleu de méthylène par la forme réduite du même thiol, pensent qu'il se formerait un composé d'addition entre les formes thiol et dissulfure, plus actif que la forme thiol elle-même.

Ce point de vue est appuyé par les recherches de Michaelis et Barron (74) sur les complexes métalliques de la cystéine.

Il faut mentionner aussi l'opinion de Bersin qui pense que l'autoxydation se ferait en passant par la forme de



Pour résumer les connaissances acquises à ce sujet, nous donnons les conclusions trouvées dans la monographie si bien documentée de Binet et Weller (75).

« Nous admettons, par conséquent, que le glutathion réduit est un corps autoxydable et dont la vitesse d'oxydation est fortement influencée par le pH du milieu, par la température et surtout par la présence de métaux pourvus de propriétés catalytiques soit positives (Cu, Fe, Se, Te) soit négatives (Ag, Zn, Cd, Bi). »

La transformation réversible et thermostable du glutathion réduit en glutathion oxydé a été prouvée et étudiée par Hopkins et Dixon (76). Le glutathion, par sa faculté d'oxydo-réduction, peut restaurer en anaérobiose le pouvoir réducteur (réduction du BM) et en aérobie le pouvoir respiratoire (absorption d'O₂ et élimination de CO₂) d'un tissu inactivé par lavage à l'eau bouillante.

L'aptitude du glutathion à se réduire dans les tissus et à s'oxyder ensuite en présence de l'oxygène atmosphérique ou d'un colorant accepteur d'H, suggère l'idée qu'il pourrait intervenir comme transporteur d'H dans le processus d'oxydation des corps du métabolisme ou de certaines dégradations fermentatives.

C'est toujours Hopkins qui apporte la preuve que le glu-

tathion favorise l'oxydation des graisses et surtout des protéines musculaires (77).

Ce sont pourtant uniquement les protéines possédant des groupements -SH fixes qui sont oxydées par le glutathion oxydé et seulement dans un milieu à réaction neutre ou légèrement alcaline.

Les protéines ainsi oxydées peuvent être ensuite réduites par le GSH. Il s'établit ainsi un équilibre entre les groupements -SH protéiniques fixes et ceux solubles du glutathion. L'oxydation et la réduction dépendent des concentrations relatives du GSH et GSSG en solution, ainsi que la quantité et de l'état de ces mêmes groupements fixes.

Jusqu'ici, l'oxydo-réduction du glutathion, n'a pas été mise en relation avec un système diastasique défini, malgré les travaux de Hopkins et Elliott (78), suivant lesquels le foie de veau posséderait un système réducteur thermolabile, appréciable surtout chez les animaux bien nourris, et un système oxydable thermostable, catalysé par le fer.

Un pas en avant dans cette direction a été fait par Mann (79) qui réduit le glutathion par le glucose en présence d'un extrait de foie de bœuf. Une réduction semblable a été obtenue par Meldrum (80) avec des globules rouges intacts en présence de glucose. Meldrum et Tarr (81) précisent que la réduction est due au système diastase-co-diastase de Warburg et Christian, le glutathion étant réduit par ce système, mais seulement en présence d'acide hexosemonophosphorique. Ogston et Green (82) réussissent la réduction du glutathion par l'hexose-diphosphate comme donneur d'hydrogène. Le glutathion permet une augmentation de 117 % de l'absorption d'oxygène par l'hexose-diphosphate.

Des travaux tout récents ont mis en évidence que l'acti-

vité de certaines diastases est liée à l'intégrité de leurs propres groupements -SH et apportent en même temps un bel exemple de la faculté d'oxydo-réduction du glutathion.

Hopkins et Morgan (36) montrent qu'en oxydant la succino-déhydrogénase par du GSSG ou l'alloxane, on arrête son activité en même temps qu'elle perd ses groupements SH; on la réactive ensuite en la réduisant par le GSH.

L'inhibition provoquée par l'acide monoiodacétique est irréversible.

Des résultats semblables qui entraînent les mêmes conclusions sont obtenus par Rapkine (83) dans un travail sur la diastase qui catalyse l'oxydo-réduction suivante :

triosephosphate + pyruvate $\rightarrow$ phosphoglycérate + lactate

La déhydrogène oxydée par le GSSG, l'I₂ ou le ^{traitée par} Cu₂O, est inactivée; traitée ensuite par des réducteurs comme le GSH, la cystéine ou le H₂S, elle retrouve son activité.

*
**

Voici donc le glutathion lié au sort de l'hydrogène et à ses migrations au cours du métabolisme glucidique. Pour bien apprécier son importance, il faut connaître la destinée de l'H au cours des fermentations. Le fait que la fermentation alcoolique soit caractérisée par des réactions d'oxydo-réduction a été déjà vu par Lavoisier. Actuellement « tout le monde s'accorde sur la position centrale qui revient à l'aldéhyde acétique et la conception aldéhydcentriste réunit tous les suffrages » (84). L'accord est pourtant moindre sur la manière dont l'aldéhyde est hydrogéné. Les uns sont pour l'hydrogénation directe, par l'H arraché à la molécule du sucre à un certain moment, « pour les autres, dont Meyerhof, l'hydrogénation est indirecte; elle résulte d'une

réaction d'oxydo-réduction qui entraîne le triose-phosphate » (84).

Nous savons pourtant aujourd'hui, que la transformation de l'aldéhyde glycérophosphorique hydratée en acide phosphoglycérique, se fait avec une libération d'hydrogène qui est capté par la cozymase (85). Suivant la nature du métabolisme glucidique, la dihydrocozymase ainsi formée, cède ensuite son hydrogène, soit à l'acide pyruvique pour donner l'acide lactique, soit à l'acétaldéhyde pour donner l'alcool éthylique (*).

Le fait admis, que dans les fermentations il y a une activation de l'H, implique l'existence de certaines substances qui font l'office de transporteur d'H.

Ce rôle est certainement accompli par les codéhydrases I et II (86) et peut-être par les flavines (87) (88).

Par contre, malgré les propriétés d'oxydo-réduction que nous avons passées en revue, il n'est pas encore établi que le glutathion soit un transporteur d'hydrogène.

*
**

Pourtant, le glutathion et autres composés sulfhydrilés fixes ou solubles jouent dans l'organisme d'autres rôles encore, qu'il est nécessaire de mentionner. La zookynase de Waldschmidt-Leitz, qui active certaines diastases protéolytiques n'est autre que le glutathion (82). On connaît maintenant beaucoup de diastases dont la partie active est formée par les groupements -SH protéiniques. Il faut voir à ce sujet la revue détaillée de Bersin (90) et l'étude de Smythe (60) sur l'uréase, celle de Hopkins sur la succino-

(*) Réactions : 13, 14, 19, 20 et 21 de Parnas (35).

déshydrase (36), de même que l'étude déjà citée de Rapkine (83) se rapportant à la déshydrogénase qui catalyse l'oxydo-réduction de l'acide pyruvique et du triosephosphate.

D'après Quastel et Wheatley (91), le glutathion modifierait la réaction de Pasteur en exaltant seulement la fermentation aérobie du glucose par la levure, sans toucher ni à la fermentation anaérobie ni à la respiration. La cystéine présente une action semblable tout en augmentant légèrement aussi la respiration.

Bumm et Appel (92), en étudiant l'influence du glutathion sur la glycolyse, croient aussi à une modification réversible de la réaction de Pasteur, car le GSH seul augmente la glycolyse aérobie d'un tissu jusqu'aux limites de l'anaérobiose; le tissu étant ensuite débarrassé du glutathion, son activité retombe à la normale. Pourtant des expériences assez minutieuses conduites par Baker (93) sur la glycolyse aérobie des tissus n'ont jamais montré une influence quelconque du glutathion sur la réaction de Pasteur.

La glutathion aurait en outre la faculté de dévier la fermentation; avec un substrat tel que l'hexosediphosphate, la levure fraîche mise en présence de toluène et de glutathion produit de l'acide lactique (94).

Le rôle du glutathion le moins discuté est son rôle de régularisation du potentiel d'oxydo-réduction (95), qui lui permet de maintenir dans les milieux de culture un niveau de réduction suffisamment bas, nécessaire à certaines réactions biologiques et à la vie de certains microorganismes.

Les microorganismes anaérobies peuvent se développer en présence d'une petite quantité de composé sulfhydrilé quelconque, même en aérobie (96).



En résumé, plusieurs rôles sont attribués au glutathion.

1) On pense qu'il pourrait agir comme transporteur de H dans le métabolisme glucidique de la cellule vivante.

2) En partant du fait que le glutathion agit comme tampon d'oxydo-réduction dans des milieux de culture, il est permis de lui attribuer le même rôle à l'intérieur des cellules vivantes.

3) Nous avons vu d'autre part qu'il existe certaines diastases, comme la succinodéshydrase du muscle et la déshydrase étudiée par Rapkine (83), qui doivent leur activité à l'intégrité des groupes protéiniques sulfhydrylés. Il est fort possible que le glutathion ait le rôle de maintenir l'intégrité de ces groupements.

4) Enfin le glutathion sert d'activateur à la méthylglyoxalase et à certaines diastases protéolytiques.

D'autre part, il est bien établi que les acides monohalogénés agissent *in vitro* sur les groupements thiolés libres : glutathion, cystéine, etc... et sur les -SH protéiniques fixes.

L'objet principal de nos recherches sera de contrôler l'hypothèse de l'action des acides monohalogénés sur le glutathion dans leurs processus d'inhibition de la fermentation alcoolique.

DEUXIEME PARTIE

METHODES ANALYTIQUES

MILIEUX DE CULTURE

1° Moût de bière de densité moyenne 1030-1040, préparé suivant la méthode officielle utilisée dans la détermination de l'extrait de malt (*).

2° Eau de touraillon saccharosée.

Trente grammes de touraillons sont enveloppés dans un morceau de tissu blanc, et plongés dans un litre d'eau soumis à l'ébullition pendant 20 minutes.

Après refroidissement, à 20°, on presse le tissu et l'on ajoute 150 gr. de saccharose, 1 gr. de phosphate d'ammoniaque, 1 gr. d'acide tartrique et 0,5 gr. de sulfate de Mg. On filtre ou l'on encolle suivant l'utilisation ultérieure.

Ces deux milieux peuvent être gélosés ou gélatinés à volonté sauf l'eau de touraillons lorsque son acidité est trop grande. La stérilisation est faite dans des autoclaves à 110° pendant 20 minutes, en ayant bien soin que la température

(*) Voir à ce sujet : *Ann. Brass. et Dist.*, t. 6, 1903, p. 265.

et la durée soient nettement inférieures à celle de l'encollage.

3° Milieu artificiel. Nous nous sommes également servis des levures acclimatées, dans le laboratoire du Service des Fermentations de l'Institut Pasteur, à un milieu constitué par des substances chimiques définies, dont voici la composition (97) :

MILIEU P.

Solution I :

Saccharose	75,0 gr.	(NH ₄) ₂ HPO ₄ , 10 %	10 cc.
MgSO ₄ à 10 % ..	2,5 cc.	KH ₂ PO ₄ à 10 % ..	5 cc.
(NH ₄) ₂ SO ₄ à 10 %	5,0 cc.	dans 500 cc. d'eau distillée.	
K ₂ SO ₄ à 10 % ..	2,5 cc.		
FeSO ₄ {	à 10 % 0,3 cc.		
ZnSO ₄ {			
MnSO ₄ {			
dans 500 cc. d'eau distillée.			

Solution II :

Ce milieu se prépare séparément en deux portions. Chacune de ces portions est stérilisée à part et elles sont réunies après refroidissement volume à volume; ceci afin d'éviter une précipitation massive des ions Mg⁺⁺ et PO₄^{- -}.

DÉTERMINATION

DE PETITES QUANTITÉS DE LEVURE

Au cours de nos recherches nous avons eu plusieurs fois l'occasion de déterminer des quantités de levure. Les méthodes employées généralement dans ce but sont de trois

sortes : comptage des cellules de levure à l'hémacytomètre, mesure de l'opacité d'une suspension par néphélométrie et enfin, détermination du poids sec. Une critique détaillée des différentes méthodes nous est donnée par Weber (98) qui jette définitivement son dévolu sur la pesée du poids sec après filtration sur un filtre en verre spécial, ce qui lui permet de peser une quantité minima de 1 mg. 5 avec une erreur de 0 mgr. 1.

Dans la majorité des cas, après avoir centrifugé dans de petits tubes à centrifugeuse tarés, et lavé une ou deux fois, nous avons séché à 100°, jusqu'à poids constant. Nous obtenons ainsi le poids sec. A cause des erreurs de pesée, nous n'avons déterminé de cette manière que les quantités estimées supérieures à environ 8 mmgr. Pour de plus petites quantités nous nous sommes servis de l'électrophotomètre Meunier (99).

Mihalz et Rottier (100), Faguet (101) sont parvenus à effectuer des mesures néphélométriques de suspension de micro-organismes donnant toute satisfaction.

Les premiers font, au cours de la description de leur propre appareil, une critique détaillée de la méthode et de la valeur des résultats obtenus. Ils établissent la courbe d'étalonnage de l'appareil en tenant compte de la nature et de la couleur de leurs différents milieux de culture. Mais ils évaluent les quantités de microbes en nombre de cellules, ce qui entraîne de grosses erreurs suivant Weber. Faguet obtient une courbe de croissance continue dans les conditions de croissance même, ce qui malheureusement est par trop aléatoire avec des levures dont le dépôt est rapide, l'agglutination souvent énorme et la durée de l'expérience trop longue.

Nous avons effectué nos mesures sur des suspensions

dans un tampon de pH 6,4 et rapporté les résultats en poids sec par unité de volume. L'étalonnage de l'appareil a donc été fait au moyen d'une suspension, dont une partie servait à la détermination du poids sec par centrifugation et pesée du résidu obtenu à 100°, tandis que l'autre partie était soumise à différentes dilutions connues et examinées au néphélomètre.

Si l'on porte en abscisses les graduations de l'appareil et en ordonnées le poids sec de levure, on obtient finalement une droite. Dans le cas des suspensions de levures normales et blanches, la précision atteint 5 %; les courbes correspondantes aux levures Cramant et Springer sont presque superposables, alors que la courbe attribuée à la levure Dortmund se trouve placée légèrement au-dessus des autres.

Par contre, dans le cas des levures accoutumées, qui présentent des variations de forme et de dimensions et surtout une forte coloration, la précision tombe à 15 %. C'est la coloration qui gêne le plus les résultats, coloration provoquée dans les levures accoutumées surtout par les milieux troubles et foncés.

Pour y remédier, nous nous sommes servis de milieux fortement encollés, aussi clairs que possible. Malgré tout, nous retrouvons ici encore la courbe de la levure Dortmund accoutumée au-dessus des deux autres.

La suspension de levure dont le poids est à déterminer est centrifugée, lavée et soumise ensuite à plusieurs dilutions successives à l'aide du même liquide tampon. Parmi les lectures effectuées à l'appareil on doit obtenir au moins deux chiffres qui se trouvent dans la partie moyenne de la graduation.

En se reportant à la courbe d'étalonnage on peut lire

deux valeurs qui, après calcul, doivent correspondre au même poids sec cherché.

En conclusion, le poids sec peut être pesé directement avec beaucoup de précision s'il dépasse une certaine valeur. Des quantités très faibles sont mesurables par néphélométrie avec une approximation très satisfaisante pour les levures normales et saines et un peu moins pour les levures empoisonnées.

NUMÉRATION DES CELLULES DE LEVURE MORTES

Nous verrons par la suite que l'action des acides halogénés aboutit à la mort de nombreuses cellules de levure et que l'accoutumance n'est qu'une sélection des cellules résistantes parmi une foule d'autres, affaiblies ou mortes.

Nous nous sommes donc souvent trouvés dans la nécessité de déterminer approximativement la proportion entre les cellules mortes et les cellules vivantes. Le procédé classique employé dans ce cas, la coloration par le bleu de méthylène, a été sévèrement critiqué par Fink (192). Suivant cet auteur la coloration par le bleu de méthylène dépend de la réaction et des électrolytes du milieu, facteurs qui modifient la perméabilité de la membrane cellulaire, règlent la pénétration de la matière colorante à l'intérieur de la levure, seule cause de la mort de cette dernière. En poussant ces investigations sur la manière de compter les colonies sur moût gélatiné dans des boîtes de Petri, il conclut qu'en opérant non stérilement par des dilutions dans des tampons ou dans l'eau physiologique, il y a toujours un déchet important et que, dans les meilleures conditions de stérilité et de dilution dans du moût, on ne trouve que

90 % du nombre des cellules comptées. Avec des levures parfaitement saines, nous avons répété ces essais qui comportent en fin de compte deux sources d'erreurs : la première a trait à la numération au moyen de l'hémacytomètre, la seconde découle des observations de Fink.

Nous avons alors imaginé une manière de compter exactement et directement les cellules stériles et celles donnant des colonies en effectuant le moins de dilutions possibles de la suspension primitive. Dans un tube de moût gélatiné, on introduisait une goutte de notre suspension bien agitée. Une lamelle couvre-objet était enduite sur une face par ce moût gélatiné et posée ensuite directement soit sur une chambre de Van Tieghem, soit sur une lame à alvéole.

En durcissant, la gélatine collait la lamelle à la chambre. Douze heures après, on pouvait déjà compter au microscope les levures restées isolées et les colonies. Partant de l'idée qu'une colonie provient d'une cellule on peut ainsi avoir le rapport des colonies à la totalité des levuresensemencées qu'on ramène à 100 :

$$N \text{ levures vivantes p. } 100 = \frac{p \text{ colonies} \times 100}{p + m \text{ cellules isolées}}$$

Dans ces conditions, la stérilité ne joue aucun rôle. Il faut prendre garde d'avoir sur la lamelle un nombre de cellules suffisant pour offrir une bonne moyenne. D'autre part les globules doivent être bien isolés afin d'éviter l'empiètement de colonies les unes sur les autres au cours de leur éventuelle multiplication. Certes, un perfectionnement important consisterait dans le comptage des cellules au moment de leur ensemencement sur la lamelle et dans le comptage des colonies formées à partir de ces mêmes cellules, ce qui serait réalisable avec une chambre claire. De toute

façon les résultats ont été excellents et plusieurs essais parallèles nous ont donné une précision de 4 %, à condition de compter pour chaque lamelle environ 200 cellules.

MESURE DE LA RESPIRATION ET DE LA FERMENTATION

Nous avons employé, pour ces mesures, l'appareillage et la méthode si sensible de Warburg (103) et en particulier ce que Dixon appelle la méthode simple et directe (104).

Pour la mesure de la respiration seule, on ajoute de la potasse à 10 % dans le diverticule central qui absorbe le CO_2 dégagé. Dans ces conditions, la seule variation dans la pression des gaz n'est plus due qu'à l'absorption de l'oxygène que l'on calcule ensuite par la formule :

$$X_{\text{o}_2} = h_{\text{o}_2} k_{\text{o}_2} \text{ ou } k \text{ est une constante} = \frac{Vg \frac{273}{T} + Vf \alpha}{P_0}$$

(Vg est le volume du gaz, Vf le volume du liquide, α le coefficient de solubilité du gaz).

Un second manomètre nous donne au même moment, la pression résultant de l'absorption de l'oxygène d'une part et du dégagement total du CO_2 d'origine à la fois respiratoire et fermentative d'autre part.

A un moment donné nous avons donc :

$$h_{\text{co}_2} = \frac{X_{\text{co}_2}}{k_{\text{co}_2}} \text{ et } h_{\text{o}_2} = \frac{X_{\text{co}_2}}{k_{\text{o}_2}} \quad (h_{\text{o}_2} \text{ et } X_{\text{o}_2} \text{ étant négatifs})$$

h lu sur le manomètre, représente la somme des deux :

$h_{O_2} + h_{CO_2}$ soit :

$$h = \frac{X_{CO_2}}{k_{CO_2}} + \frac{X_{O_2}}{k_{O_2}}$$

On en tire la valeur de $X_{CO_2} = (h - \frac{X_{O_2}}{k_{O_2}}) k_{CO_2}$ en remplaçant X_{O_2} par la valeur trouvée dans le premier manomètre.

Puisque l'on considère le quotient respiratoire égal à 1, le volume du CO_2 dégagé étant égal au volume de O_2 absorbé, on retranche du CO_2 calculé précédemment la valeur de X_{O_2} et on obtient ainsi : $X_{CO_2} - X_{O_2} = \text{volume de } CO_2 \text{ dégagé par la fermentation aérobie}$. La valeur correspondante de la fermentation anaérobie nous est directement donnée par la formule : $X_{CO_2} = k_{CO_2} h_{CO_2}$.

Les résultats sont ensuite calculés en mm^3 de gaz échangé par 1 mgr. de poids sec et par heure. Ce nombre de mm^3 est désigné par Q_{O_2} pour la respiration, par $Q_{CO_2}^{O_2}$ pour la fermentation aérobie et par $Q_{CO_2}^{N_2}$ pour la fermentation anaérobie (105).

Nous n'approfondirons pas davantage les détails techniques d'une méthode classique et qui ont été rigoureusement observés.

Nous nous permettons pourtant d'insister un peu plus sur la manière dont nous avons opéré en atmosphère d' N_2 . L'azote était d'abord purifié par passage à travers des co-

peaux de cuivre chauffés au rouge puis accumulé dans un gazomètre. De là, par une rampe de verre à plusieurs tubes latéraux, il passait dans les manomètres en traversant les récipients et, grâce à un tube coudé fixé sur le diverticule latéral, s'échappait dans l'eau du bain.

Ce dispositif proposé par Dixon a l'avantage de faciliter le contrôle du passage du gaz qui se fait dans les conditions et à la température de l'expérience ultérieure. En dehors du manomètre destiné à la mesure de la fermentation anaérobie, nous en avons un autre contenant de la potasse dans son godet central, et qui était aussi rempli d'azote, en ayant bien soin que le courant de gaz ne soit pas plus rapide que celui passant par les autres manomètres. On obtenait ainsi un témoin, capable de nous déceler la moindre trace d'oxygène resté, cette quantité d'oxygène étant en tout cas supérieure à celle restée dans les autres manomètres. En effet il y avait toujours une très légère respiration, trahie par une dépression de quelques mm. et qui pouvait durer de 15 à 40 minutes au plus. Ce n'est que lorsque toute diminution de pression avait cessé que l'on commençait les lectures.

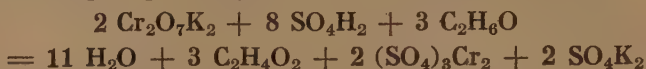
DOSAGE DU SUCRE

Le sucre contenu dans nos milieux de fermentation a été dosé suivant la méthode classique de G. Bertrand (106).

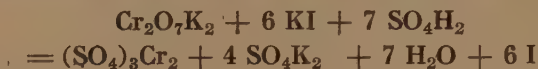
Nos dosages n'ont du reste porté que sur le saccharose de l'eau de touraillons. On procédait donc de prime abord à une interversion du dihexose par de l'acide chlorydrique à 4 % environ et chauffé 30 minutes au bain-marie à 70°.

DOSAGE DE L'ALCOOL

Nous avons dosé l'alcool formé au cours de la fermentation, par la méthode de Martini et Nourrisson (107), dont voici le principe : On soumet le moût fermenté à la distillation et l'alcool passe à l'état de vapeur dans un mélange sulfochromique qui l'oxyde à l'état d'acide acétique :



Le bichromate en excès est ensuite réduit par l'IK :



Enfin on titre l'iode libéré par l'hyposulfite :



On emploie pour ce dosage, une solution de bichromate $n : 60$ (4,908 gr. par l.) et une solution décinormale d'hyposulfite (24,8 g. par l.). Un cc. de la solution de bichromate correspond à 1,151 mg. d'alcool.

Cette méthode utilisée couramment dans le Service des Fermentations de l'Institut Pasteur donne de très bons résultats et a l'agrément de la netteté du virage propre à l'iodométrie.

DOSAGE DU BROME

Nous avons vu que l'hypothèse d'une réaction inhibitrice entre les acides halogénés et le glutathion admet la libération de l'halogène sous forme d'acide : HI, HBr, HCl.

Nous espérons donc suivre le sort des acides monohalogénés ajoutés aux fermentations en dosant leur halogène respectif dans le milieu ou la levure, sous leur forme organique ou ionisée. Il nous fallait donc mettre au point des méthodes de dosage de ces halogènes.

Nous avons choisi pour le dosage du brome la méthode de Denigès-Chelle (108) car elle avait été déjà appliquée par ces auteurs à des vins et, d'après Florentin et Munsch (109), aurait, grâce à un traitement préalable à l'éther, permis de différencier le brome organique du brome minéral. Nous n'avons pas l'intention d'étudier en détail cette méthode [pour l'historique de ce procédé, voir Damien (110)], mais nous en exposerons le principe et insisterons sur les points qui ne nous ont pas donné satisfaction.

On commence par une minéralisation, suivant le procédé indiqué par Denigès et Chelle; les cendres obtenues sont reprises par une solution à 10 % d'acide azotique purifié. Dans la liqueur acide on isole le Br par précipitation au nitrate d'argent; le précipité est ensuite centrifugé et lavé jusqu'à élimination complète de l'acide nitrique. On procède ensuite à la réduction du BrAg par l'H, produit de la réaction de l'acide sulfurique sur des fragments de Zn ajoutés au précipité. Le Br se trouve maintenant à l'état de BrH ou de BrZn , il ne reste plus qu'à mettre en évidence cette quantité de Br, qu'on libère d'abord par oxydation à l'aide d'un mélange sulfochromique en présence de HCl .

Enfin le Br donne avec les réactifs fuchsinés (*) une coloration rose violacée que l'on concentre par agitation dans du chloroforme. L'appréciation de la quantité du Br se fait par comparaison avec une série préparée extemporanément, contenant des doses connues de BrK . On pourrait apprécier ainsi, suivant les auteurs, 5 γ gr. de Br dans la prise d'essai, soit 0,5 mg. par litre.

Nos premiers essais ont porté sur le contrôle de la bonne marche, en essayant de retrouver des quantités de BrK

(*) Un autre indicateur de Br-employé, a été la fluorescéine suivant la méthode de Hahn (111).

et d'acide bromacétique connues, ajoutées au moût. Or, n'ayant jamais retrouvé nos quantités adjointes, nous avons procédé par élimination successive des différentes manipulations. Il ne faut attribuer la raison de l'insuccès ni à la minéralisation, suspectée en premier lieu, ni à la précipitation par le nitrate d'Ag. Finalement des bromures en quantités connues et soumises à l'opération de réduction n'ont plus été retrouvées.

Nos pertes variaient entre 20 et 50 % pour des quantités de 10 à 100 γ de Br.

Nous sommes donc d'avis que les pertes doivent bien avoir lieu au moment de la réduction.

Nous verrons dans un chapitre suivant, que les dosages du Br et de l'I se sont avérés inutiles à cause de la forte hydrolyse des acides iodacétique et bromacétique qui provoque la formation de HI et BrI.

DOSAGE DU CHLORE

Le dosage direct des chlorures d'après Charpentier et Volhard (112) est gêné par les matières albuminoïdes du moût. Nous avons alors choisi la méthode de Laudat (113) dont voici l'application que nous avons faite à nos milieux de culture, pour le dosage du chlore sous forme ionisée.

A un volume connu de moût, nous avons ajouté environ 5 cc. d'acide azotique pur, une quantité précise et en excès de NO_3Ag $n/20$, une solution de permanganate de K saturée, jusqu'à obtention d'une liqueur absolument claire après ébullition. Le chlorure d'argent se dépose en gros grumeaux. S'il y a trop de permanganate, reconnaissable par de petits cristaux bruns de MnO_2 , on ajoute quelques gouttes de H_2O_2 pour détruire ce MnO_2 . On filtre, on lave

le dépôt et sur le filtrat clair on titre l'excès de NO_3Ag par une solution de SCNK $n/20$ en présence de quelques gouttes d'alun ferrique. Un cc. de cette solution de NO_3Ag correspond à 1,775 mg. de Cl. La quantité minima titrable, correspondant à 0,02 cc., est de 0,035 mg. Des solutions titrées plus étendues avaient le défaut de rendre difficile l'appréciation de la fin de la réaction.

Mais cette pratique, bonne pour les chlorures, ne suffisait pas à mobiliser le Cl contenu dans l'acide monochloracétique. Pour libérer ce Cl, nous avons en premier lieu fait bouillir notre moût pendant 15 minutes avec environ $1/5$ de son volume de soude pure. Le liquide épais qui reste est acidifié par de l'acide nitrique qu'on ajoute en excès, la suite des opérations continuant identiquement à celles déjà décrites.

Le dosage de l'excès du NO_3Ag peut se faire également par la méthode de Mac Lean et Van Slyke (114), dans laquelle l'appréciation de la fin de la réaction est des plus nettes.

On précipite les halogènes en présence d'une acidité connue d'acide nitrique par du NO_3Ag en excès et l'on filtre. On ajoute ensuite au filtrat une solution qui contient un nitrite, de l'amidon et du nitrate tri-sodique; ce dernier, ayant pour rôle de neutraliser l'acide azotique présent, est ajouté du reste dans un rapport bien défini par la technique. On titre enfin par l'IK dont l'excès est immédiatement oxydé par les nitrites et l'I libéré donne une coloration bleue avec l'amidon, ce qui indique la fin de la réaction.

La neutralisation de l'acide azotique de manière à établir une acidité propice à la coloration de l'amidon est le point délicat de la méthode.

D'après les auteurs, l'acidité pourrait varier de 10 % sans

changement pour la coloration. Il est regrettable que cette limite soit très facilement dépassée, le citrate tri-sodique n'étant pas un bon tampon. De plus, nous avons souvent une solution concentrée de soude que nous neutralisons par de l'acide nitrique qu'il fallait enfin tamponner. On voit de suite la difficulté d'ajuster ces différentes solutions jusqu'à la réaction du milieu requise. Nous avons pourtant réussi à établir un rapport entre la soude, l'acide nitrique et les citrates qui permet un bon dosage (*).

Nous sommes revenus pourtant à la méthode de Laudat qui est très simple et qui finalement nous a donné des résultats excellents avec des erreurs maxima de 2 %.

DOSAGE DE L'AZOTE

Au cours de nos recherches nous avons effectué quelques dosages de N en appliquant la méthode de Kjeldahl adaptée à des semi-microdéterminations (116).

On opère sur 2 cc. de liquide à doser et la titration finale a lieu avec des solutions d'acide sulfurique et de soude $n/70$. Un cc. de cette solution d'acide sulfurique correspond à 0,2 mg. de N.

DOSAGE DU GLUTATHION

Pour le dosage du glutathion nous nous sommes servis de la méthode de Binet et Weller (117) que nous avons adaptée aux dosages dans les levures.

La première opération concerne la préparation des ex-

(*) La modification apportée par Foster (115) pour le dosage du Cl dans le sang, qui consiste dans la précipitation des matières protéiques par l'acide métaphosphorique, ne nous a pas donné de bons résultats.

traits. Dans ce but on emploie l'acide trichloracétique à 10 % qui coagule les matières protéiques en même temps qu'il dissout le glutathion. La solution obtenue ne doit pas être abandonnée plus d'une heure, car il y a une légère baisse de glutathion avec le temps. Dans ces extraits acides on précipite le glutathion. A cet effet, les auteurs se sont servis du lactate de Cd qui précipite quantitativement et à peu près spécifiquement le glutathion entre pH 6,2 et 7. Mais ces limites absolument strictes sont heureusement faciles à réaliser par une neutralisation avec de la soude très étendue jusqu'à coloration bleuâtre du bleu de bromothymol. Si la limite vers l'alcalinité est dépassée, le glutathion s'oxyde instantanément et ne précipite plus. Le précipité obtenu se conserve longtemps à l'abri de la lumière. Ce n'est que le glutathion réduit qui précipite avec le lactate; il s'agit alors de réduire le glutathion oxydé avant la précipitation.

Le réducteur employé est le cyanure de Na ou de K ou bien le cyanure double de K et de Cd. Toutes ces substances présentent l'avantage de réduire intégralement en solution alcaline le disulfure en thiol et de ne pas gêner ensuite la précipitation élective du glutathion par le lactate de Cd.

La réaction serait la suivante :



Mauthner (118) qui a découvert la réduction des RSSR par les cyanures explique la réaction de la manière suivante :



Binet et Weller pensent que ces produits ne sont que l'aboutissement lointain d'une réaction secondaire que voici :



Une fois la réduction réalisée, il s'agit de précipiter tout le GSH présent.

Mais avec le Cd il se forme du cyanure de Cd insoluble et nuisible au dosage, dont il faut se débarrasser. Les auteurs ont tourné cet obstacle en profitant de la propriété des cyanures de Cd d'être solubles dans un excès de cyanure alcalin et de ne précipiter qu'à pH 7,8 et au-dessus. Pour réaliser ces conditions, on ajoute une solution de lactate de Cd acidifiée par de l'acide acétique qui, en même temps, libère le CNH et acidifie le milieu. On neutralise ensuite à pH 6,8 et l'opération continue comme pour le GSH.

Les auteurs ont préconisé récemment l'acidification par de l'acide trichloracétique à 5 % (119).

Voici donc le glutathion isolé. Le dépôt de glutathion mercaptide de Cd est centrifugé et dissout dans de l'acide phosphorique à 10 %.

On titre enfin par iodométrie en ajoutant un excès d'I M/250 que l'on titre en retour par de l'hyposulfite de soude M/500.

Voyons maintenant l'application détaillée du dosage du glutathion dans les levures. Deux à trois g. de levure fraîche sont pesés exactement, de préférence dans un verre de montre couvert, parallèlement à une autre quantité qui servira à la détermination du poids sec. La levure est passée dans un mortier et bien broyée avec du sable. On y ajoute environ 10 cc. d'alcool à 90° pour tuer les levures et après deux minutes, 10 cc. d'acide trichloracétique à 10 %.

On jette le tout sur un filtre placé dans un entonnoir fixé sur une fiole conique à vide. Le très léger vide qui se forme ainsi suffit à faciliter la filtration souvent trop lente. On lave encore trois fois avec 10 cc. d'acide trichloracétique le mortier et le filtre, jusqu'à disparition de la réaction au

nitroprussiate dans les filtrats. On homogénéise le filtrat et on pipette 10 cc. que l'on verse dans des tubes à centrifugeuse d'environ 50 cc.. On a ainsi deux tubes pour le dosage du GSH et deux pour le glutathion total et ce qui reste est versé dans une éprouvette graduée; le volume total sera donc de 40 cc. + n cc. indiqués par l'éprouvette.

On neutralise les quatre lots d'abord par de la soude à 50 % jusqu'au voisinage de la neutralité puis on continue par de la soude à 0,5 % jusqu'au virage bleu de bromothymol.

On ajoute aux tubes destinés au dosage du GSH un peu plus de 2 cc. de lactate de Cd à 2 %, qui provoque un trouble et une acidification qu'on neutralise par de la soude à 0,5 %.

Aux deux autres tubes on ajoute 1 cc. de cyanure simple ou double à 5 % et on abandonne pendant 30 minutes, après quoi on verse dans chacun d'eux la solution de lactate de Cd à 3 % acidifiée avec 0,1 % d'acide acétique, jusqu'au virage franchement jaune, puis encore 2 cc. de lactate à 2 % en continuant comme pour le GSH.

Dans la dernière note (119), les auteurs modifient légèrement leur technique; au bout de 30 minutes de repos en présence de cyanure on ajoute d'abord 4 cc. de lactate à 2 % puis 0,5 cc. de solution d'acide trichloracétique à 5 % et on neutralise. La formation du dépôt se fait après un temps assez variable suivant les cas, ne dépassant généralement pas six heures.

Dorénavant, les opérations sur les quatre tubes seront identiques. On centrifuge à grande vitesse, on verse brusquement le liquide surnageant le dépôt et on laisse les tubes renversés. Les deux tubes qui ont contenu du cyanure sont

soigneusement essuyés à l'intérieur par un morceau de papier filtre fixé sur une baguette.

Les précipités sont dissous dans 10 cc. d'acide phosphorique à 10 %.

Dans leur dernière technique (119), les auteurs préconisent l'emploi de l'acide phosphorique à 10 % contenant 5 g. de ClNa , ce qui supprime l'autoxydation des iodures avec rebleuissement de l'amidon, cause de difficulté dans l'appréciation de la fin de la réaction.

On ajoute ensuite exactement 1 cc. de solution de $\text{I M}/250$ préparée extemporanément à partir d'une solution décimormale et l'on titre l'excès d'I en présence de 2 à 3 gouttes d'une solution d'amidon à 1 %, par de l'hyposulfite $\text{M}/500$ préparée comme la solution d'iode. La solution d'iode est préalablement ajustée à la solution d'hyposulfite. Pour le calcul on se sert de la formule suivante que nous reproduisons d'après les auteurs :

$$T = \frac{(2n - n') \times 0 \text{ mg. } 614 \times 100}{P} \times \frac{V}{v}$$

« où n signifie le volume d'I $\text{N}/250$ ajouté en excès; n le volume d'hyposulfite de $\text{Na N}/500$ ajouté jusqu'à disparition de l'excès d'I; P le poids prélevé de levure en gramme; V le volume total de l'extrait; v le volume examiné de l'extrait, soit 10 cc. dans notre cas; le coefficient 0 mg. 614 représente la quantité de glutathion réduit (poids moléculaire 307) correspondant à 1 cc. d'hyposulfite de soude [une molécule d'I oxyde deux molécules de glutathion réduit ($2 \text{ GSH} + \text{I}_2 = \text{GSSG} + 2 \text{ HI}$) et, par conséquent 1 cc. d'hyposulfite de $\text{Na N}/500$ correspond à 0,5 cc. d'I $\text{N}/250$ qui correspond à 0 mg. 614 de glutathion réduit] ». En multipliant par 100, on obtient le taux du glutathion réduit en mg. pour 100 g. de levure fraîche. Ce nombre multiplié

100
par $\frac{\quad}{S}$, où S représente le poids sec pour cent de levure fraîche, nous donne le taux pour 100 gr. de poids sec.

La différence entre les taux du glutathion total et du glutathion réduit, nous donne le taux de glutathion oxydé.

Voici quelques détails sur le dosage du glutathion dans le suc de levure Lebedeff (120). La préparation du suc de levure a été effectuée suivant la technique de Ragnar Nils-son et Frithiof Alm (121). Une partie de levure sèche, obtenue par dessiccation à 25° d'une levure basse, est mise en suspension dans trois parties d'eau et abandonnée pendant deux heures, à la température de 37°.

Le suc de levure est le liquide recueilli après une centrifugation vigoureuse de cette suspension.

Après de nombreux essais de défécation avec l'acide trichloracétique ou l'alcool, nous avons constaté que les résultats deviennent reproductibles lorsqu'on emploie une solution, faite extemporanément, contenant 10 % d'acide trichloracétique et 20 % d'alcool éthylique.

On défèque 5 cc. du suc de macération par 20 cc. de la solution alcoolique d'acide trichloracétique, on filtre, on lave trois fois par 10 cc. de la même solution et on ramène le filtrat à 100 cc. par de l'eau distillée. On traite 5 cc. de cette solution de la même manière que l'extrait trichloracétique de levure.

Le calcul se trouve dans ce cas réduit à la formule suivante :

$X \text{ mg.} = (2n - n') \times 0,614 \times m$ (m est un facteur exprimant la dilution du suc).

Des dosages parallèles de glutathion dans la levure et dans le suc de macération, nous ont prouvé que la totalité du glutathion passe en solution,

Le suc de levure contient certainement de nombreuses protéines sulfhydrilées.

Nous avons soumis le suc à une précipitation complète par le lactate de Cd, sans défécation préalable. La suite des manipulations se fait très aisément.

On constate ainsi que l'iode finalement absorbé correspondant au glutathion, est de 75 à 80 % de la quantité totale d'iode absorbé sans défécation. Pourtant on ne peut attribuer la différence uniquement aux protéines sulfhydrilées.

Notre rôle n'étant pas de faire une critique de la méthode, nous nous bornerons à formuler quelques observations sur nos dosages.

Le glutathion pur Hoffmann - La Roche ajouté a été retrouvé avec des pertes allant jusqu'à 6 %. Les dosages du glutathion réduit des levures nous ont toujours donné de très bons résultats avec une erreur limite de 5 %. Par contre, nous avons eu au début certaines difficultés pour le glutathion total, pour lequel on trouvait des différences allant parfois jusqu'à 15 %. Avec l'expérience acquise, nous sommes arrivés à avoir de meilleurs résultats, sans pouvoir toutefois garantir une précision supérieure à 10 %.

Il faut pourtant mentionner que la dernière technique proposée par les auteurs (119) et que nous avons appliquée au dosage du glutathion dans le suc de levure, a été beaucoup plus satisfaisante.

TROISIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I

ACCOUTUMANCE DES LEVURES AUX ACIDES ACÉTIQUES MONOHALOGÉNÉS

Toutes nos expériences ont porté sur trois races de levure provenant de la collection de l'Institut Pasteur, choisies de manière à avoir trois types différents et bien définis.

- 1° Une levure de boulangerie, la levure Springer.
- 2° Une levure basse, la levure de brasserie Dortmund.
- 3° La levure Cramant, que l'on emploie couramment dans la champagnisation.

*
**

On a déjà vu qu'un bon moyen d'étudier l'action d'un antiseptique sur les levures est d'essayer de les accoutumer à ce corps, en tâchant d'apercevoir tout changement

éventuellement réalisé. Nous connaissons les méthodes d'accoutumance de Kossiakoff (6) et d'Effront (7). Le principe est d'avoir une série de levures normales, cultivées dans un milieu sans antiseptique, parallèlement à une série de même génération où les doses d'antiseptique seront de plus en plus fortes. Effront ne passe à une concentration supérieure que lorsque la levure a réussi à fermenter la moitié du sucre offert en présence des fluorures.

Nos expériences ont eu lieu dans des tubes à essais contenant 10 cc. de liquide.

L'acide halogéné a été ajouté soit en solution pure, soit en solution neutralisée par de la soude. Par exemple, pour avoir une concentration M/1.000, nous avons pris 8 cc. de milieu, plus 1 cc. de solution d'acide M/100, plus 1 cc. de suspension à ensemercer; et pour avoir une concentration M/2.000, à 8 cc. de milieu nous avons ajouté 0,5 cc. de la solution d'acide M/100 plus 0,5 cc. d'eau stérile et plus 1 cc. de la suspension de levure. La stérilisation a été effectuée sur le milieu seul, les additions supplémentaires ainsi que les ensemencements étant faits avec des pipettes graduées stériles.

Quelques mesures de pH nous ont renseigné sur l'acidité des milieux et les variations de cette acidité provoquées par l'acide monohalogéné ajouté. Nous avons effectué les mesures de pH par l'électrométrie à l'aide de l'électrode à quinhydrone.

A des concentrations très faibles, celles employées pour l'acide iodacétique surtout, la variation est négligeable et en effet aucune différence n'a été observée entre l'action de l'acide pur ou de l'acide neutralisé. Par contre dans le cas de l'acide chloracétique dont la concentration s'élève à M/30, l'acidité s'est trouvée fortement accrue, provoquant

l'agglutination des levures et des précipitations dans les milieux de culture.

Les solutions d'acide doivent être faites extemporanément pour les acides iodacétiques et bromacétiques qui s'hydrolysent rapidement en solution aqueuse et beaucoup plus rarement, toutes les trois semaines, pour l'acide chloracétique qui est stable. La fermentation a été contrôlée généralement par l'observation du dégagement de CO_2 et pour être plus précis, nous nous sommes servis des tubes einhorn.

1) Nous avons commencé par déterminer la quantité d'acide halogéné qui arrête totalement la fermentation de la levure normale. Une série de tubes à essai contenant 10 cc. de milieu additionné d'acide halogéné à des concentrations variant à peu près en série arithmétique, estensemencée par la même quantité de levure jeune, en pleine fermentation, soit environ 10 mg. de poids sec. A partir d'une certaine concentration, la fermentation devient plus lente, avec la période de latence plus longue, pour finir par s'arrêter complètement.

Plusieurs expériences parallèles nous ont montré qu'avec rigoureusement le même milieu et la même levure, on trouve toujours la même concentration d'acide nécessaire pour arrêter la fermentation. Cette dose varie avec l'acide, le milieu, la race et la quantité de levure (tableau III).

Tableau III

**Concentrations d'acides halogénés
arrétant la fermentation des levures normales**

	CH_2ICOOH		CH_2BrCOOH		CH_2ClCOOH	
	Moût de bière	Eau de touraillons	Moût de bière	Eau de touraillons	Moût de bière	Eau de touraillons
Springer ..	M/3.000	M/8.000	M/1.500	M/1.800	M/125	M/125
Cramant ..	M/3.000	M/8.000	M/1.200	M/1.600	M/125	M/125
Dortmund.	M/6.000	M/12.000	M/2.000	M/4.000	M/175	M/225

Le moût de bière utilisé : pH 5,4; l'eau de touraillons utilisée : pH 3,8 à 4,6; quantité de levuresensemencées : 5-8 mg. de poids sec.

Nous avons pu confirmer en outre, sans approfondir le sujet, que le pH du milieu influence beaucoup l'activité de ces antiseptiques et que plus il augmente dans les limites envisagées, plus l'inhibition diminue.

Chaque préparation de touraillons donne des résultats légèrement différents.

Ces différences semblent être en rapport avec la variation de richesse et de l'acidité de ces milieux; par contre, dans les moûts de bière les résultats sont assez constants.

2) Nos expériences d'accoutumance ont été ainsi conduites : Nous avons pris une levure fermentant partiellement sous l'influence d'une quantité quelconque d'acide halogéné et par quelques passages successifs dans la même concentration d'antiseptique nous avons essayé d'augmenter sa fermentation.

Même après une dizaine de passages, la levure n'a jamais retrouvé toute son activité normale. Cette levure a étéensemencée alors dans quatre tubes : le premier contenait le milieu de culture pur; le second, avait la même concentration en antiseptique que le tube servant à l'ensemencement; le troisième, une dose légèrement plus forte que le second et le quatrième une dose plus forte que le troisième. Généralement la fermentation arrêtée dans le quatrième tube était déjà bien nette dans le troisième. Si la levure du troisième tube finissait par fermenter d'une manière satisfaisante après un ou deux passages dans cette même dose, on continuait l'accoutumance à une concentration d'antiseptique légèrement plus forte et ainsi de suite.

Toutes ces levures empoisonnées présentent une période de latence de 24 et parfois 48 heures, après quoi la fermentation continue légèrement 2 à 3 jours. Les repiquages ont donc été faits après le deuxième ou le troisième jour. A partir d'un certain moment, la levure fermente de moins en moins, en dépit de plusieurs passages.

On arrive ainsi à une concentration limite à laquelle il semble que la levure ne puisse plus s'accoutumer. Richet (122), en étudiant l'accoutumance du ferment lactique au TINO_3 avait déjà montré qu'il y a une limite à l'accoutumance qu'il est impossible de dépasser. Pourtant cette première limite atteinte n'est pas très fixe et il nous est arrivé de pouvoir la franchir grâce à une levure accoutumée, culti-

vée pendant une génération dans du moût pur et soumise à nouveau à l'acclimatation (*).

Dans le tableau IV, nous indiquons les concentrations maxima supportées. Ces valeurs ne sont que relatives, et sont susceptibles de variations sous l'influence des facteurs précédemment examinés.

On peut donc accoutumer et faire encore fermenter des levures dans des concentrations d'acides halogénés 5 fois plus fortes que les concentrations qui arrêtent la fermentation d'une levure normale.

Tableau IV
Concentrations maxima d'acides monohalogénés
supportées par les levures accoutumées

Levures	CH_2ClCOOH		$\text{CH}_2\text{B}_2\text{COOH}$		CH_2ICOOH	
	Moût de bière	Eau de touraillons	Moût de bière	Eau de touraillons	Moût de bière	Eau de touraillons
Springer ..	M/800	M/2.000	M/300	M/350	M/30	M/30
Cramant ..	M/800	M/2.000	M/300	M/350	M/30	M/30
Dortmund.	M/800	M/2.000	M/300	M/900	M/75	M/50

(*) Comme nous l'avons déjà indiqué, il suffit d'avoir une nouvelle préparation du milieu pour observer de légers changements dans le comportement des levures. Les variations de la concentration en sucre du milieu ont montré qu'il y a un optimum pour le moût de bière de densité 1035-1045, sans nous conduire à d'autres conclusions présentant un intérêt.

C'est pour remédier aux inconvénients des milieux de culture habituels, que nous avons essayé d'employer le milieu minéral artificiel décrit à la deuxième partie. Nous nous sommes servis d'une levure Cramant, déjà habituée à ce milieu (97). Malheureusement, de très petites doses d'acide, M/40.000, suffisent à arrêter complètement la croissance et la fermentation, sans aucun succès d'accoutumance. Nous verrons dans les expériences qui vont suivre, qu'elles nécessitent des quantités assez grandes de levure, pratiquement impossible à obtenir avec le milieu artificiel additionné d'acide halogéné, ce qui nous a déterminé à abandonner ces cultures.

*
**

Une remarque digne d'être mentionnée se rapporte au mécanisme biologique de l'accoutumance, qui se fait par sélection confirmant ainsi l'opinion d'Effront (8). En présence des acides monohalogénés, le pourcentage des cellules mortes est énorme et seulement 10 à 25 % des levures accoutumées donnent des colonies.

Les acides halogénés provoquent donc un grand déchet de levure et ce n'est qu'une faible minorité résistante à son action, qui transmet la faculté de fermenter aux générations suivantes.

L'accoutumance se perd facilement dès que la levure accoutumée est cultivée pendant une ou deux générations dans un milieu normal. Portée dans un milieu ordinaire, elle retrouve toute son activité ancestrale.

Les levures traitées par ces antiseptiques changent aussi d'aspect. Elles sont brunes surtout dans les milieux fortement caramélisés ou âgés, ce qui est causé, suivant notre

avis, par la pénétration du milieu de culture dans les cellules mortes. Elles sont souvent agglutinées et au microscope elles présentent des granulations et quelques déformations. Sur des moûts gélosés traités par les acides halogénés à des concentrations correspondantes au milieu liquide, elles poussent très difficilement, finissant par sporuler après un certain temps.

Une conclusion intéressante concernant la similitude du mécanisme d'accoutumance aux divers acides halogénés, peut être tirée du fait qu'une levure accoutumée à une certaine dose de l'un des acides supporte aussi bien des concentrations élevées des autres acides. L'accoutumance n'est pas spécifique pour un seul des acides monohalogénés.

*
**

Le trait essentiel qui se dégage de ces expériences est la différence que présente les races de levures employées, lorsqu'on les met en présence des acides halogénés.

Cette différence valable pour les trois acides et qui tend à disparaître par l'accoutumance, est très visible sous l'influence des doses d'antiseptiques qui arrêtent la fermentation de la levure normale. On constate que les levures Springer et Cramant ont la même résistance et supportent des doses plus fortes que la levure Dortmund.

L'action des acides varie énormément suivant leur halogène : la plus forte inhibition est exercée par l'acide iodacétique, puis par l'acide bromacétique et la plus faible par l'acide chloracétique.

Le milieu et le pH sont aussi des facteurs modifiant la sensibilité des levures.

CHAPITRE II

ESSAIS DE FERMENTATION
MESURE DU POUVOIR RESPIRATOIRE
ET DU POUVOIR FERMENT

Nous avons observé déjà au cours des essais d'accoutumance que les levures vivant dans un milieu empoisonné par les acides monohalogénés fermentaient peu et lentement, sans jamais récupérer leur pouvoir de fermentation normal, même après de nombreux passages dans une concentration d'antiseptique inchangée.

Mais ces remarques ne se basaient que sur des observations qualitatives. C'est en vue d'une détermination quantitative que nous avons entrepris ces essais de fermentation en appliquant la méthode courante du Service des Fermentations de l'Institut Pasteur.

La préparation des tubes a été poursuivie comme il suit : On introduit dans une série de tubes de 22 mm., 17 cc. d'eau de touraillons; on stérilise le tout à l'autoclave; on ajoute la quantité désirée de solution d'antiseptique; on ensemence avec 0,5 cc. de suspension de levure dans laquelle on dose à part le sucre et l'alcool; on complète jusqu'à 20 cc. par de l'eau stérile. On adapte ensuite aux tubes, des bouchons de liège supportant un tube en U muni de deux petites boules remplies d'acide sulfurique, et on les porte enfin à l'étuve à 25°.

Depuis le moment où la fermentation s'est déclarée jusqu'à ce qu'elle soit arrêtée, on dose l'alcool et le sucre dans

un tube pour chaque série, toutes les 12 heures dans la période active, toutes les 24 heures ou 48 heures ensuite.

Nous avons par ailleurs, fait quelques essais parallèlement au dosage du glutathion. Pour ceci, la même suspension de levure qui servait aux essais de fermentation étaitensemencée dans un milieu identique contenu dans des flacons de manière à avoir une hauteur de liquide analogue à celles des tubes, soit 8 cm. Le dosage du glutathion a eu lieu à la fin de la fermentation des flacons, qui concordait à 12 heures près celles avec des tubes. Nous n'insisterons pas sur les détails des manipulations suivantes, les procédés de dosage que nous avons utilisés ont été déjà exposés dans une autre partie de notre travail.

Nous avons calculé le rapport entre le sucre consommé et l'alcool formé, dont la valeur théorique d'après le bilan de Pasteur est de 1,96.

L'intérêt de ce rapport est de nous indiquer les changements éventuels du cours de la fermentation. Dans tous les cas examinés, ce rapport a été trouvé très voisin du nombre théorique, sauf au début de la fermentation, où il est le plus grand. Il semble donc que nous n'ayons pas affaire à une déviation de la fermentation avec accumulation d'un produit intermédiaire et que l'inhibition a lieu dès le début de l'attaque des sucres.

Pour mieux comparer la fermentation des levures normales avec celles des levures accoutumées nous avons réuni dans un seul tableau (V) les résultats finals des essais (alcool formé et sucre consommé à la fin de la fermentation) et dans deux autres (VI et VII) les courbes de formation de l'alcool d'une seule race de levure à son état normal et à différents degrés d'accoutumance.

Dans le cas des levures accoutumées fermentant dans un

Tableau V

Essais de fermentation avec des levures normales et accoutumées : résultats finals

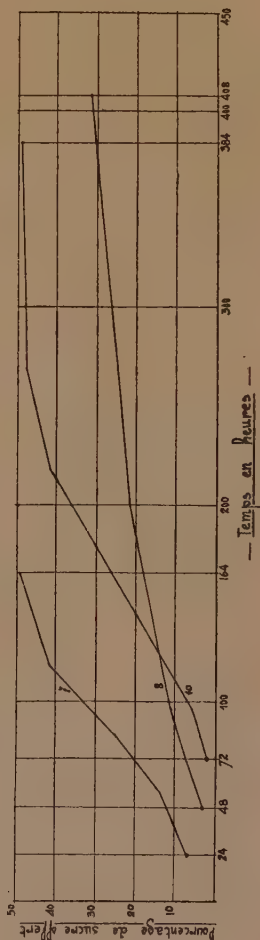
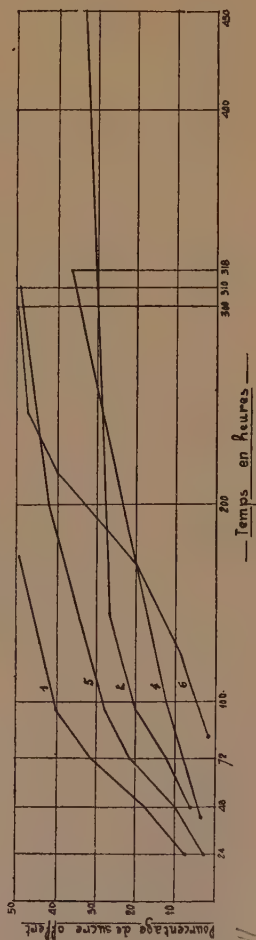
	Springer Témoin.	Springer accoutumée à CH_2ClCOOH M/40		Springer accout. à CH_2ClCOOH M/1.000.	Springer accout. à CH_2ClCOOH M/40 ensem. ds. eau tour. pur.	Springer accout. à CH_2ClCOOH M/1.000 ensem. ds. eau tour. pur.	Cramant Témoin.	Cramant accoutumée à CH_2ClCOOH M/40		Cramant accout. à CH_2ClCOOH M/1.250 ensem. ds. eau tour. pur.	Cramant accout. à CH_2ClCOOH M/1.000	Dortmund Témoin.	Dortmund accout. à CH_2ClCOOH M/1.500
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Temps en heures de la durée de la fermentation ..	120	455		318	310	300	164	408		3,84	210	164	23,4
Sucre consommé p. 100 du sucre offert .	96,8	69,8	59	75	99	98,1	98,7	66	61,4	97,6	49,4	99,4	58,7
Alcool formé p. 100 du sucre offert ..	48,6	33,6	28,9	36	49,5	49,7	47	31,4	30,6	48,4	24	50,2	28,3
Rapport : sucre consomm. alcool formé.	2,02	2,07	2,05	2,08	2	1,97	2,09	2,1	2,40	2,02	2,06	1,98	2,07

Tableaux VI et VII

Courbes de fermentation

TABLEAUX VI ET VII

• Courbes de fermentation •



LES COURBES EXPERIMENT L'ALCOOL FORMÉ RAPPORTE A 100 DU SUCRE OFFERT EN FONCTION DU TEMPS

Les numéros des courbes des tableaux VI et VII correspondent à ceux des colonnes du tableau V.

milieu acide halogéné, l'inhibition de la fermentation est visible tout le long de ce processus. Après un grand retard au départ, pouvant parfois atteindre trois jours, la fermentation se poursuit ensuite lentement pendant plusieurs jours, pour s'arrêter enfin avant d'avoir consommé tout le sucre offert.

Malheureusement, comme il ressort des tableaux V et VIII, les résultats obtenus sont trop inconstants pour permettre d'établir une relation étroite entre le degré d'accoutumance, le pouvoir fermentatif (exprimé en sucre consommé pour cent de sucre offert), et le taux de glutathion des levures.

Tableau VIII

*Comparaison entre le pouvoir fermentatif
et le taux de glutathion de diverses levures accoutumées*

Levures	Springer CH_2ClCOOH M/40		Cramant CH_2ClCOOH M/40		Springer CH_2ICOOH M/1.000	Cramant CH_2ICOOH M/1.000	Dortmund CH_2ICOOH M/1.500
	1	2	3	4	5	6	7
Sucre consommé p. 100 du sucre offert ..	59	69,8	61,4	66	75	49,4	58,7
Mg. GSH p. 100 g. pds. sec. de levure	226	188	313	252	320	281	215

Lorsqu'il s'agit des levures accoutumées ensemencées dans un milieu de culture ordinaire, on observe un grand retard au départ de la fermentation, et une période de fermentation lente. Mais brusquement celle-ci s'accélère pour finir bientôt, après avoir consommé le sucre offert et avoir formé l'alcool comme la levure normale.

Si nous nous rapportons aux essais de sélection par isolement sur des milieux solides, il faut croire qu'il se forme une génération jeune ; cette génération issue des levures accoutumées, malades, préservées des antiseptiques, retrouve toutes ses qualités héréditaires.

Le départ retardé de la fermentation aurait pu être causé par une trop petite quantité de levure vivante ensemencée. Il se pourrait aussi que les acides halogénés affaiblissent la croissance de la levure. Il s'agissait donc de suivre la variation de la quantité de levure en même temps que la marche de la fermentation.

Pour ces expériences l'ensemencement a été fait par un volume exactement mesuré d'une suspension, dont on déterminait la concentration en poids sec de levure. Le contenu des tubes à essai était centrifugé et le culot de levure lavé deux fois. Les eaux de lavage étaient réunies au milieu de culture, le tout servant au dosage du sucre et de l'alcool, tandis que les levures étaient remises en suspension dans du tampon phosphaté et diluées convenablement pour la mesure néphélométrique, ou bien si la quantité était suffisante, séchées directement dans l'étuve à 100°. Les résultats ont été exprimés en poids sec.

On remarque, que sous l'influence des acides halogénés, il ya une diminution appréciable de levures formées (tableau IX).

Cependant la variation du poids sec ne suffisait pas à

mettre en évidence la relation entre celui-ci et la fermentation. Nous avons alors imaginé des rapports semblables à ceux employés par Effront pour déterminer le rapport d'accroissement et celui de la puissance du ferment de ses levures fluorées.

Ainsi le rapport entre le poids sec en mg. à son maximum au cours de la fermentation et le poids sec ensemençé nous donne l'accroissement. De même le rapport de l'alcool apparu au poids sec formé au même moment (exprimés en mg.) fournit la puissance ferment. Il ressort tout de suite avec évidence que la levure accoutumée s'accroît moins que la levure normale. Le rapport d'accroissement des levures accoutumées est beaucoup plus faible que celui des levures normales; mais comme ce rapport varie énormément, avec la quantité ensemençée on ne peut en tirer aucune conclusion satisfaisante.

Nous le répétons, les acides halogénés exerçant une action inhibitrice sur la croissance des levures.

Le rapport indiquant le pouvoir ferment est de 8 à 10 pour les levures Springer et Cramant et de 9 à 12 pour la levure Dortmund. Dans le cas des levures accoutumées, ce rapport montre une diminution de leur pouvoir ferment. Il existe pourtant quelques cas assez curieux, où la valeur du rapport est identique pour les levures normales et les levures accoutumées de même race.

Tableau IX
Croissance des levures normales et accoutumées, comparée à leur pouvoir de fermentation

	MOÛT DE BIÈRE A.			EAU DE TOURAILLON A.					MOÛT DE BIÈRE B.		EAU DE TOURAILLON B.	
	1	2	3	Gramant normale	Dortmund normale	Spinger accout. à CH_2ClCOOH M/40	Gramant accout. à CH_2ICOOH M/1.000	Dortmund accout. à CH_2ICOOH M/1.500	Dortmund normale en présence de CH_2ICOOH M/8.000	Dortmund normale en présence de CH_2ICOOH M/6.000	Gramant normale en présence de CH_2ICOOH M/4.000	Gramant normale en présence de CH_2ICOOH M/850
Poids sec ensemencé mg. ..	0,214	0,27	0,218	0,072	0,05	0,093	0,129	0,19	1,32	0,96	0,6	1,21
Poids sec formé mg.	51,4	54	44	84	76	32	29,8	89	28	26	31	19,38
Rapport d'accroissement .. (1)	240	200	202	1.170	1.500	320	230	207	21,3	27,2	51,7	16
Puissance fermentation. (2)	8,6	8,2	11,6	7,95	9,8	10,5	6	6,7	8,8	6	7,45	4,2

(1) Le rapport d'accroissement = mg. de poids sec formés : mg. de poids sec ensemencés.

(2) Puissance de fermentation = mg. d'alcool formé : mg. de poids sec formé.



Le procédé qui nous a servi précédemment pour déterminer le pouvoir ferment et la croissance n'étant pas suffisamment précis et sensible nous avons utilisé la méthode manométrique de Warburg.

Les levures servant à ces mesures ont été cultivées rigoureusement dans le même moût de bière. On introduisait 70 cc. de ce moût dans de petits flacons de 100 cc., auxquels on ajoutait la solution d'acide halogéné, en complétant ensuite suivant le cas par de l'eau distillée stérile jusqu'à 75 cc..

Trois jours après, au moment de la pleine fermentation l'on aspirait le liquide surnageant à la trompe, on centrifugeait et lavait plusieurs fois avec un tampon phosphaté de pH 6,4 (124). On reprenait ensuite le dépôt par le tampon glucosé à 1 % et l'on amenait à environ 40 cc. Un volume de cette suspension, exactement pipeté servait à la détermination du poids sec à 105°, auquel nous avons rapporté les quantités de gaz échangées.

A partir de la même suspension, par des dilutions convenables, nous obtenions finalement la suspension devant servir aux mesures manométriques.

Une seule et même dilution suffisait pour la fermentation et la respiration dans le cas des levures cultivées dans de fortes concentrations d'antiseptique. Avec les levures normales, la dilution destinée à la mesure de la fermentation était 2,5 fois plus petite que celle destinée à la mesure de la respiration. Finalement, l'expérience avait lieu sur 2 cc. de la suspension finale, à 25°, et durait au moins deux heures; les lectures effectuées toutes les 15 minutes nous per-

mettaient de constater la marche absolument régulière des échanges gazeux.

Pour chaque levure étudiée, nous avons fait la mesure de la respiration seule, en introduisant dans le godet central 0,2 cc. de potasse à 10 % ; nous avons procédé aussi à la mesure de la fermentation aérobie et enfin à celle de la fermentation anaérobie. Chacune de ces mesures a été faite en double, la différence entre ces deux essais parallèles n'ayant jamais dépassé 6 %.

Les résultats ont été calculés d'après Warburg (105) où l'on indique par la lettre Q la quantité de gaz échangé en mm. cubes en une heure par mg. de poids sec (tableau X).

Le pouvoir respiratoire et le pouvoir ferment des levures accoutumées diminuent fortement lorsque la concentration de l'acide halogéné augmente.

La levure Cramant accoutumée à l'acide monoiodacétique M/3.000 respire et fermente comme la levure normale. La même race de levure accoutumée au même acide mais à une concentration de M/850 perd presque complètement ses facultés de respiration et de fermentation. Il est vrai que dans ces conditions, nous sommes à la limite extrême de l'accoutumance.

Dans tous les cas c'est la fermentation aérobie qui est la plus touchée, ensuite la fermentation anaérobie et un peu moins la respiration.

Tableau X
Pouvoir fermentatif et Pouvoir respiratoire

		Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^O$	$Q_{CO_2}^{N_2}$	Quotient d'oxydation
Springer	Témoin	25,0	117,0	148,0	1,24
	Accout. à $CH_2ClCOOH$ M/30	5,8	8,75	16,3	1,3
	Accout. à CH_2ICOOH M/1.500	12,1	27,1	37,5	0,86
Cramant	Témoin	30,0	102,0	137,0	1,17
	Accout. à $CH_2ClCOOH$ M/30	3,75	5,8	10,77	1,32
	Accout. à CH_2ICOOH M/3.000	29,1	98,0	135	1,27
	Accout. à CH_2ICOOH M/2.000	23,0	41,2	66,5	1,11
	Accout. à CH_2ICOOH M/850	5,1	12,4	18,7	1,25
	Accout. à CH_2ICOOH M/1.500 et cultivée ds. du Moût de bière pur	28,4	96,0	131,5	1,25
Dofmund	Témoin	9,25	114,6	122,0	0,8
	Accout. à CH_2ICOOH M/1.500				
	Accout. à CH_2ICOOH M/850 et cultivée ds. du Moût de bière pur	6,9	21,0	26,8	0,845
		11,5	120,4	128,0	0,66

$$\text{Quotient d'oxydation} = \frac{Q_{CO_2}^{N_2} - Q_{CO_2}^O}{Q_{O_2}}$$

En calculant le quotient d'oxydation de Meyerhof (125) on s'aperçoit qu'à part un seul cas, il n'y a pas de différence notable avec la normale.

Les levures accoutumées,ensemencées dans du moût exempt d'antiseptique, reprennent entièrement leurs facultés primitives.

CHAPITRE III

VARIATION DU TAUX DE GLUTATHION DES LEVURES SOUS L'INFLUENCE DES ACIDES MONOHALOGÉNÉS

Une des premières recherches à faire était de mettre en corrélation l'action des acides halogénés avec le taux du glutathion des levures et les variations de celui-ci sous l'influence de ces acides et de l'accoutumance.

Pour bien doser le glutathion, il faut opérer sur environ deux g. de levure fraîche et sur la même quantité pour la détermination du poids sec. Il s'agissait donc d'en obtenir environ 5 g. ce qui est facilement réalisable avec des levures accoutumées.

Dans ce but, nous avons introduit 500 cc. de milieu dans des boîtes de Fernbach à tubulure latérale permettant la décantation, ou bien dans des flacons d'un litre pour les cultures en profondeur. Pour les cultures en surface, nous

nous sommes servi de boîtes de Nicolle contenant 500 cc. de milieu gélosé. Alors qu'une boîte de Fernbach suffisait pour les levures normales, il en fallait deux ou même trois pour les levures accoutumées qui pratiquement ne poussent pas sur gélose.

Les levures décantées étaient centrifugées et lavées une ou deux fois dans un milieu physiologique. Nous avons conduit la recherche de manière à avoir toujours un témoin constitué par la levure normale de même génération, cultivée dans un moût identique à celui de la levure accoutumée.

Chaque boîte de 500 cc. étaitensemencée par le contenu entier d'un tube à essai soit 10 cc. de suspension de levure accoutumée, ce qui faisait 20 à 40 mg. de poids sec.

Une quantité à peu près pareille de levure normale étaitensemencée dans le témoin. Le troisième ou le quatrième jour, en pleine croissance et fermentation, on faisait la récolte. Sans revenir sur la méthode de dosage décrite ailleurs, nous passerons immédiatement à l'examen des résultats.

Dès les premiers essais nous avons pu constater que la nature du milieu influençait énormément le taux du glutathion; c'est pourquoi nous avons classé les résultats de manière à ne comparer que les dosages provenant du même milieu.

1) Le taux du glutathion dans les levures normales (*) (tableau XI).

(*) Les quantités de GSSG trouvées dans la levure, sont au-dessous des erreurs d'expérience; c'est pourquoi nous avons toujours exprimé la glutathion en mg. de GSH p. cent g. de poids sec de levure.

Tableau XI
Taux du GSH dans les levures
Sa variation avec la race, la nature du milieu de culture et la méthode de culture

	MOUT DE BIÈRE						EAU DE TOURAILLON		
	Moût Gélifié			Cultures en milieu liquide			Cultures en milieu liquide		
				Boîtes de Fernbach			B. de Fernbach	Flacons Haut. liq. 10 cm.	
	A	B	C	A	B	C			
Springer	678	684	682	997	972	—	850	602	840
Cramant	719	690	684	1.031	945	1.013	815	567	835
Dortmund	590	584	—	753	657	715	614	450	628

Les chiffres désignent le taux de GSH exprimé en mg. p. 100 g. de poids sec.

Les lettres A, B, etc... désignent les diverses préparations d'une même sorte de milieu de culture.

Tout d'abord il convient de noter la variation de ce taux suivant la race. La levure Dortmund possède une quantité de glutathion nettement inférieure à celle contenue dans les deux autres dont les teneurs sont à peu près semblables. Il est intéressant de rapprocher ces chiffres de ceux indiquant la résistance aux acides halogénés, chiffres qui varient exactement de la même manière (tableau III). Nous avons déjà vu qu'il est un autre facteur influent : le milieu de culture. Alors que dans les différents moûts de bière les résultats sont presque constants, ils présentent des écarts énormes dans les diverses préparations d'eau de touraillon. Des dosages d'N nous ont montré que l'encollage diminuait sensiblement la richesse du milieu, et comme cet encollage n'est pas toujours fait dans des conditions rigoureusement identiques, il en résulte un appauvrissement variable. Quelques essais comparatifs entre la richesse en N de l'eau de touraillon et la teneur en glutathion des levures cultivées dans le milieu correspondant, permettent de s'apercevoir que le taux du glutathion varie dans le même sens que la richesse du mout (tableau XII).

Tableau XII

*Relation entre la richesse du milieu en N,
et le taux du GSH
des levures cultivées dans ce même milieu*

MILIEU	mg. N p. 100 cc.	mg. GSH p. 100 pds. sec.
1. Eau de touraillons non en- collée + peptone à	85,4	880
2. Eau de touraillons encollée + peptone	81,4	697
3. Eau de touraillons non en- collée pure	52,4	632
4. Eau de touraillons encollée pure	46,4	596

Nous avons employé dans ces expériences la levure Cramant.

Enfin un troisième facteur influençant le taux du glutathion est la méthode de culture des levures. Les levures cultivées en milieu liquide dans des boîtes de Fernbach ont à peine moins de glutathion que celles cultivées en profondeur dans les flacons. Elles sont par contre sensiblement plus riches en cette substance que celles poussées à l'air sur milieu gélosé, dans des boîtes de Nicolle.

Lorsque la levure pressée de boulangerie est mise en culture dans du moût de bière, on remarque une diminution sensible du taux du glutathion. Mais en tenant compte de la quantité totale de levureensemencée et récoltée, on

s'aperçoit que l'on retrouve — après une culture de 24 à 48 heures dans le moût de bière — la totalité du glutathion introduit par l'ensemencement.

2) L'influence exercée par les acides halogénés sur le taux du glutathion des levures normales mises en leur contact. Pour ces recherches, une douzaine de g. de levure fraîche ont été mis en suspension dans 500 cc. du milieu additionné de la quantité désirée d'acide halogéné, tandis qu'une autre partie servait au dosage du glutathion. Suivant la concentration en antiseptique, la fermentation avait lieu légèrement, ou pas du tout, et trois jours après, on décantait et on dosait le glutathion sur ces levures.

Nous avons toujours trouvé une forte baisse du taux de glutathion (tableau XIII). Cette baisse réelle dans des levures qui fermentent encore, n'empêche pas la présence d'une quantité encore appréciable de glutathion dans des levures dont la fermentation est totalement inhibée. Il n'y a pas toujours parallélisme entre la concentration en acide halogéné et la baisse du taux du glutathion.

Pourtant, si l'on envisage la quantité de levure et par conséquent la quantité de glutathion introduite et la quantité récoltée, il est alors évident que la disparition du glutathion suit de près l'augmentation de la concentration de l'antiseptique (tableau XIII, colonne 5).

Tableau XIII

*Influence des acides monohalogénés
sur le glutathion contenu par les levures*

		MILIEU DE CULTURE	G S H				GSH disparu mg.
			Taux de la levure ensemencée.	Quantité introduite mg.	Taux de la levure récoltée,	Quantité récoltée mg.	
	Levure de Boulangerie 1		1	2	3	4	5
		500 cc. m. de b. pur.	796	29,6	725	30,6	—
		500 cc. m. de b. + CH ₂ ICOOH M/1.000	796	28,8	352	13,8	15
	Levure de Boulangerie 2	200 cc. m. de b. pur.	1.155	13,05	710	12,95	—
		200 cc. m. de b. + CH ₂ ClCOOH M/100	1.155	10	576	7,75	2,25
		200 cc. m. de b. + CH ₂ ClCOOH M/75	1.155	13,3	628	8,92	3,38
		200 cc. m. de b. + CH ₂ ClCOOH M/50	1.155	11,97	448	6,14	4,79
	Levure de Boulangerie 3	200 cc. m. de b. pur.	792	14,42	610	14,75	—
		200 cc. m. de b. + CH ₂ ClCOOH M/50	792	14,8	455	7,95	6,85
		200 cc. m. de b. + CH ₂ ClCOOH M/25	792	15,1	372	5,8	8,73

Le taux de GSH est exprimé en mg. p. 100 g. de poids sec.

3) Les levures accoutumées montrent aussi une forte baisse du taux de leur glutathion (tableau XIV). Malheureusement cette diminution ne présente pas une relation nette avec les concentrations d'acide, sauf dans quelques rares cas. Des générations différentes de la même levure accoutumée au contact des mêmes doses d'acide, nous ont donné des taux assez variables.

Néanmoins le taux de glutathion des levures accoutumées, cultivées à plusieurs reprises dans une concentration identique d'acide halogéné, finit par se stabiliser avec de légères variations, autour d'une même valeur. Dans ces circonstances on ne remarque plus de disparition de glutathion en présence des acides halogénés.

4) On pourrait peut-être imaginer que, le glutathion éventuellement produit en excès par la levure accoutumée a été capté par l'acide halogéné, auquel cas nous ne trouverions alors par le dosage que la quantité échappée à son influence.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons ensemencé les levures acclimatées dans du moût ordinaire exempt d'antiseptique (tableau XV).

Le taux du glutathion des levures ainsi cultivées revient à la valeur de ^{celui de} la levure normale témoin, en présentant dans quelques cas une augmentation de 8 à 12 %.

Tableau XIV
Taux de GSH dans les levures accoutumées

	Springer			Ogramant			Dortmund		
	B	C		A	C		A	B	C
MOLT DE BIÈRE	Témoin 972	Témoin —		Témoin 1.031	Témoin 1.013		Témoin 753	Témoin 657	Témoin 715
	CH ₂ ICOOH M/4.000 602	CH ₂ BrOOH M/500 484		CH ₂ ICOOH M/2.500 447	CH ₂ BrOOH M/500 284		CH ₂ ICOOH M/2.500 550	CH ₂ ICOOH M/8.000 588	CH ₂ BrOOH M/500 308
	CH ₂ ICOOH M/2.500 315			CH ₂ ICOOH M/1.500 420				CH ₂ ICOOH M/1.500 195	
	E	F		E	F		E	F	
EAU DE TOURAILLONS	Témoin 850	Témoin 602		Témoin 815	Témoin 567		Témoin 614	Témoin 450	
	CH ₂ ClCOOH M/40 226	CH ₂ ClCOOH M/40 152		CH ₂ ClCOOH M/40 313	CH ₂ ClCOOH M/40 191		CH ₂ ClCOOH M/80 395		
	CH ₂ ClCOOH M/30 185	CH ₂ ICOOH M/1.500 320			CH ₂ ICOOH M/1.500 281			CH ₂ ICOOH M/1.500 215	

Les chiffres de ce tableau représentent le taux de GSH exprimé en mg. p. 100 g. de poids sec. Les lettres A, B, C, etc., désignent les diverses préparations d'une même sorte de milieu de culture. Ce sont les mêmes préparations que celles représentées dans le tableau XI.

Tableau XV

*Taux de GSH des levures accoutumées,
cultivées dans des milieux exempts d'antiseptique*

LEVURES ENSEMENCÉES	MILIEU	G S H mg. p. 100 g. de poids sec		
		Levure ensemencée	Levure récoltée	Levure normale
Springer accout. à CH_2ClCOOH M/30	Eau de tourail- lons	185	856	850
Springer accout. à CH_2ICOOH M/2.500	Moût de bière	315	998	945
Cramant accout. à CH_2ICOOH M/1.000	Moût de bière gélisé	201	937	719
Cramant accout. à CH_2ICOOH M/1.500	Moût de bière	417	1.286	1.031
CH_2ClCOOH M/40	Eau de tourail- lons	27	417	482
Cramant accout. à CH_2ICOOH M/1.000	Eau de tourail- lons gélisée	167	655	584

*
**

Il semble donc d'après ces résultats, que l'accoutumance n'a pas provoqué une augmentation du taux de glutathion de la levure.

Les acides monohalogénés provoquent une forte baisse de glutathion de la levure normale. Les levures accoutumées à ces antiseptiques présentent un taux de glutathion très diminué,

Toutefois la levure accoutumée possède une limite inférieure du taux de glutathion, qui ne peut plus être entamée par les acides halogénés.

CHAPITRE IV

RELATION ENTRE LE POUVOIR INHIBITEUR DE L'ACIDE MONOCHLORACETIQUE ET LA FRACTION DE CET ACIDE COMBINÉ AU GLUTATHION DE LA LEVURE

Nous avons vu que tous les auteurs qui ont fait des recherches à ce sujet, sont d'accord pour exprimer la réaction entre les acides halogénés et les composés thiolés par la formule :



C'est-à-dire que la réaction se traduit par une disparition de glutathion et une apparition équimoléculaire d'hydra-
cide halogéné.

On peut donc suivre la transformation de l'acide monohalogénacétique, en déterminant par le dosage, la proportion d'halogène passé à l'état d'ions.

Mais une difficulté surgit en raison de l'hydrolyse des solutions d'acide iodacétique et bromacétique avec formation de HI et HBr. Il est pratiquement impossible de faire une juste discrimination entre les ions halogènes libérés par l'hydrolyse et ceux libérés par la réaction avec le glutathion.

Ne nous étant pas immédiatement aperçu de cet inconvénient, nous avons tenté de doser le brome comme il a été décrit ailleurs.

Heureusement il en est tout autrement avec l'acide monochloracétique qui peut se conserver longtemps, soit en solution aqueuse, soit dans des milieux de culture, sans aucune libération de Cl.

Nous avons donc recherché et dosé le Cl sous forme organique ou à l'état de Cl^- , dans les milieux de culture et la levure.

Cet élément se trouve toujours sous forme de chlorure à raison de 9 à 15 mg. pour 10 cc. de moût de bière et de 22 à 26 mg. pour 100 cc. d'eau de touraillons.

Un témoin, constitué par le milieu de culture additionné d'acide chloracétique, était nécessaire pour suivre l'hydrolyse éventuelle de cet acide dans les conditions de l'expérience. Il n'y a jamais eu d'hydrolyse; pourtant nous avons comparé toutes les valeurs trouvées pour le Cl, aux chlorures contenus dans ce témoin.

Enfin par le dosage du Cl total, après saponification à la soude, nous avons toujours retrouvé avec la plus grande précision, la quantité intégrale de Cl présent dans le milieu. Cette quantité se compose du Cl propre au milieu de culture et à la levure et du Cl ajouté sous forme d'acide monochloracétique.

Le contenu des flacons ayant servi aux expériences est centrifugé; le culot de levure est lavé trois fois à l'eau distillée et les eaux de lavage sont réunies et ramenées à un volume connu. Une partie du liquide sert au dosage du Cl total et une autre au dosage du Cl^- pendant que l'on dose le Cl total et le Cl ionisé dans les levures.

Dans une première série d'expériences, nous avons uti-

lisé 20 cc. de milieu de culture introduits dans des tubes à essai etensemencé par une certaine quantité de levure accoutumée, correspondant à 15 mg. environ de poids sec. Les résultats obtenus ne mettent pas en évidence avec suffisamment de netteté, une libération d'ions Cl. De même les levures cultivées dans ces circonstances n'ont fait apparaître que des traces de Cl.

Dans une autre série d'expériences nous avons fait agir l'acide monochloracétique sur une grande quantité de levures non accoutumées et avons tenté de mettre en évidence la disparition du glutathion et une apparition éventuelle simultanée des chlorures.

On introduit dans des fioles de Fourneau, 200 cc. de moût de bière, l'acide monochloracétique neutralisé à une concentration déterminée et une forte quantité de levure pressée de boulangerie.

La quantité de levureensemencée, évaluée en poids sec, varie de 1 g. à 1 g. 8. Cette opération n'étant pas faite stérilement, les dosages ont eu lieu 24 heures après l'ensemencement.

Les résultats qui figurent dans le tableau XVI permettent plusieurs constatations.

En raison de la grande quantité de levureensemencée il faut de très fortes concentrations d'acide chloracétique pour arrêter la fermentation.

Comme nous l'avons noté dans un chapitre précédent la disparition du glutathion croît avec la concentration de l'antiseptique. Il y a d'une manière très nette une accumulation de Cl⁻ dans les levures, accumulation qui croît avec la concentration de l'acide chloracétique.

Il y a généralement une augmentation, minime des chlorures dans le milieu de culture. Pourtant, lorsque la con-

centration de l'acide chloracétique est M/40 et M/25, ce qui amène l'arrêt presque complet de la fermentation, nous constatons un enrichissement de 8 à 12 % des chlorures du moût.

Nous pensons que lorsque la concentration de l'antiseptique devient trop forte, il y a une certaine proportion de cellules de levures tuées, ce qui permet la dialyse des ions Cl formés à la suite de la réaction entre l'acide chloracétique et le glutathion de la levure.

Tableau XVI
Réaction entre le CH_2ClCOOH ajouté et le GSH contenu dans la levure

CH_2ClCOOH	GLUTATHION					mg. Cl - ds. milieu	mg. Cl - ds. milieu et levure	mg. Cl - ds. lev. récolt.	Rapport GSH disp : Cl - appar.	Observations
	mg. Intr. p. levure ensemenc.	mg. Trouvés ds. levure récolt.	Taux de la levure récolt.	mg. Disparus	mg. Cl - ds. milieu					
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
O										
Témoïn	13,05	12,95	710	—	31,46	30,8	0,29	—	fermente	
M/100	10,00	7,75	576	2,25	102,0	30,4	1,18	1,46	fermente	
M/75	13,3	8,92	628	3,38	132,89	30,35	1,45	2,9	fermente	
M/50	11,97	6,14	448	4,79	182,53	31,9	1,95	2,85	fermente peu	
O										
Témoïn	14,42	14,75	610	—	27,27	25,6	0,42	—	fermente	
M/40	14,8	7,95	455	6,85	208,72	27,7	2,05	1,9	fermente peu	
M/30	14,2	5,7	419	8,5	244,9	28,2	2,35	1,9	O	
M/25	15,1	5,8	372	8,73	310,75	28,7	2,00	1,75	O	

Levure de boulangerie A : Taux de GSH exprimé en mg. p. 100 g. de poids sec — 1156.

Levure de boulangerie B : Taux de GSH exprimé en mg. p. 100 g. de poids sec — 792.

Les essais ont eu lieu dans 200 cc. de moût de bière.

La quantité de GSH introduit ou récolté, est calculée en multipliant le poids sec de la levure par le taux respectif.

La quantité de Cl- apparue est obtenue en additionnant les quantités de Cl- apparues dans le milieu et dans la levure.

Le rapport moléculaire entre le GSH et le Cl indiqué par la formule de réaction du GSH avec l'acide chloracétique est de 8,65.

Dans nos expériences, le rapport entre le glutathion disparu et le Cl^- apparu varie entre 1,46 et 2,9.

Des expériences semblables portant sur les levures accoutumées (1,6 g. de poids sec), montrent qu'il y a une faible augmentation de Cl^- , mais par contre ne mettent plus en évidence une diminution parallèle de GSH.

Il est certain que lorsqu'on utilise les levures vivantes, on n'est jamais en présence de quantités de glutathion absolument fixes.

Pour remédier à cet inconvénient, nous avons répété ces expériences en nous servant du suc de levure de Lebedeff.

L'expérience porte sur 20 cc. de liquide glucosé à 4 % dont la moitié du volume est représentée par le suc. L'acide monochloracétique y est présent à des concentrations variables (tableau XVII).

Nous avons ici une quantité fixe de glutathion. En milieu acide, la réaction entre le GSH et l'acide monoiodacétique est presque inexistante, même lorsqu'il y a inhibition totale de la fermentation.

Dans un milieu neutre, le jus de macération ayant été préalablement neutralisé par quelques gouttes de NaOH à 5 %, la réaction entre les deux substances est plus importante. Une certaine proportion de glutathion disparaît en même temps que l'on observe une augmentation des chlorures.

Tableau XVII

Réaction entre le CH_2ClCOOH ajouté et le GSH contenu dans le suc de levure

	CH_2ClCOOH	mg. GSH ds. 5 cc. de suc de lev.	mg. GSH disparu	Cl - ds. 5 cc. suc de lev.	Cl - apparu	Rapport GSH disp. Cl - apparu	Observations
	1	2	3	4	5	6	7
Suc de levure frais.	0	18,95	—	0,584	—	—	
Liquide fermenté.	0 témoin	18,8	—	0,593	—	—	fermente
	M/75	17,75	1,05	0,731	0,138	7,8	fermente peu
	M/50	16	2,8	0,87	0,287	9,75	0
	M/40	15,50	3,3	0,965	0,372	8,9	0
	M/25	15,16	3,64	1,042	0,449	8,1	0

Suc de levure Lebedeff neutralisé.

Tableau XVIII

Résumé de l'action du CH_2ClCOOH sur le GSH contenu dans la levure normale, la levure accoutumée et le suc de levure

	TAUX de GSH	VARIATION du GSH introduit par la levure	VARIATION du Cl^-	RAPPORT GSH disp : Cl^- apparu
Levure normale	Diminue	Diminue	Augmente	$1,4 < R < 2,9$
Levure accoutumée	Constant	Constant	Augmente	
Suc de levure	—	Diminue	Augmente	$7,8 < R < 9,75$

Cette fois-ci le rapport entre le glutathion disparu et le Cl^- apparu varie entre 7,8 et 9,75, étant donc très voisin du rapport théorique 8,65.

Nous résumons dans le tableau XVIII les conséquences principales découlant de la réaction entre l'acide monochloracétique et le glutathion contenu dans les levures vivantes et dans le suc de levure.

1) La proportion d'acide combiné pour provoquer l'inhibition, est extrêmement faible, ne dépassant pas 3 p. cent.

2) L'inhibition de la fermentation est complète, même lorsqu'une forte proportion de GSH reste encore intacte. En milieu de réaction naturelle, faiblement acide, l'arrêt de la fermentation zymasique est total sans aucune diminution de GSH; avec le suc neutralisé, l'inhibition est aussi complète, bien que l'on soit encore en présence de 85 % de la quantité initiale de GSH.

3) Le rapport entre le GSH disparu et le Cl^- apparu est

stoechiométrique uniquement avec le suc neutralisé. La perte de GSH de la levure normale est relativement faible par rapport à la quantité de Cl^- apparue, alors que l'on n'observe aucune diminution de GSH dans la levure accoutumée. On peut donc penser que les levures normales, et à plus forte raison les levures accoutumées, continuent à produire du glutathion même en présence de l'acide chloracétique.

CHAPITRE V

LEVURES VIVANTES : FERMENTATION INHIBÉE PAR L'ACIDE MONOIODACÉTIQUE ESSAI DE RÉACTIVATION PAR LE GLUTATHION

Quelles conséquences peut-on tirer des expériences entreprises jusqu'ici?...

Si nous envisageons l'hypothèse de Dickens, Quastel et autres auteurs, une action quelconque des acides monohalogénés sur le glutathion contenu dans les levures n'est pas niable. Malheureusement, les choses se compliquent du fait qu'il n'existe pas de relation entre la quantité d'antiseptique, le taux du glutathion et le pouvoir ferment et respiratoire de la levure.

Il reste à étudier l'influence qu'exerce^{ler}ait sur l'inhibition une addition de glutathion. Bien entendu, l'idéal serait d'ob-

tenir une levure avec un taux de glutathion sensiblement plus élevé que la normale; c'est ce qu'on a vainement espéré réaliser par l'accoutumance. Quant à l'effet produit par l'introduction du glutathion dans le milieu de culture il peut soulever beaucoup de discussions et d'interprétations. Il n'est pas du tout probable que ce glutathion puisse pénétrer comme tel dans la cellule de levure. Par contre, on peut chercher s'il y a inhibition en présence d'un excès de glutathion. C'est en tenant compte de ces considérations, que nos essais de réactivation ont été poursuivis de différentes manières. Nous avons employé pour ces expériences de petits tubes à essai préparés comme il a été exposé plusieurs fois au cours de ce travail.

Pour chaque essai nous avons deux séries de témoins : l'une avec du moût seul, l'autre avec du moût additionné d'acide halogéné, mais sans glutathion.

Nous ajoutons le glutathion soit en solution aqueuses extemporanées s'il s'agissait de très petites doses, soit directement sous forme solide si les quantités étaient pesables avec suffisamment de précision. Vu l'importance du pH dans cette réaction, nous l'avons déterminé dans chaque série d'expériences.

Le poids sec et l'alcool introduits au moment de l'ensemencement sont déterminés par un dosage à part. On dose ensuite l'alcool et le poids sec au début et à la fin de la fermentation dans chaque essai.

Les levures destinées à l'ensemencement sont cultivées dans des flacons contenant 200 ou 400 cc. de milieu de culture, suivant la quantité de levure nécessaire. Après dix-huit heures, le moût surnageant est aspiré stérilement. Il reste 10 à 20 cc. d'une suspension très dense de levure, dont 1 cc. sera ensemencé dans chaque tube à essai.

Première série d'essais. — Le glutathion est ajouté après un certain temps de contact entre la levure et l'acide monoiodacétique.

A 10 cc. de moût de bière contenant 17,4 mg. de poids sec de levure Cramant, on ajoute au temps 0 la quantité voulue d'acide iodacétique.

On complète à 15 cc. par de l'eau distillée stérile, en tenant compte de la quantité de glutathion qui sera ultérieurement ajoutée.

Enfin, après une heure pour une série et 18 heures pour une autre, on introduit le glutathion à raison de 1 et de 5 équivalents. La réaction entre l'acide monoiodacétique et le glutathion se faisant de molécule à molécule, un équivalent de GSH correspond à la même concentration ^{mol.} d'acide.

Les résultats de cette expérience exposés dans le tableau XIX montrent que les essais 4, 5, 6, 7 sont aussi peu différents du témoin 3 que les essais 9, 10, 11 et 12 le sont de leur témoin respectif 8.

L'addition de glutathion n'a donc absolument pas modifié l'inhibition.

Tableau XIX

Influence du GSH introduit après l'arrêt de la fermentation par l'acide monoiodacétique

Levure Cramant dans du moût de bière : pH 5,8; 17,4 mg. de poids sec ensemencés

	TÉMOINS		ACIDE IODACÉTIQUE, M/4.000					ACIDE IODACÉTIQUE, M/2.500						
	môut	pur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ac. Iodacétique	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 h.	0	+	0	+	0	+	+	+		0	+	+	+	
18 h.						1 équ.	5 équ.	1 équ.	5 équ.		1 équ.	5 équ.	1 équ.	5 équ.
Alcool formé mg.	316	305			68,4	69,1	72	69,7	59,6	41,6	39,2	42,4	37,8	38,5
Poids sec formé mg.	21,4	24			5,8	7,1	6,2	5	5,3	3,1	—	4	—	2,8

Le signe + indique l'addition de la substance inscrite en tête de ligne. équ. = équivalents de glutathion.

Deuxième série. — Le glutathion est ajouté au moment de l'ensemencement, en même temps que l'acide iodacétique.

Des essais préliminaires nous ayant renseigné sur les concentrations d'acide arrêtant la fermentation, il a été choisi, pour éviter un excès d'antiseptique, des concentrations pour lesquelles la fermentation et la croissance se poursuivent encore, bien que faiblement.

Les expériences ont porté sur les levures Cramant et Dortmund cultivées dans du moût de bière et de l'eau de touraillons. Plusieurs concentrations d'acide iodacétique ont été utilisées, ainsi que des additions variables de glutathion. On introduisait dans les tubes à essai dans l'ordre suivant : 10 cc. de milieu de culture, l'acide iodacétique, le glutathion, la suspension de levure, l'eau stérile en quantité suffisante pour compléter à 15 cc.

Les résultats de cette expérience montrent que l'inhibition provoquée par l'acide iodacétique en présence du glutathion est exactement la même que dans le cas où l'acide est tout seul.

Troisième série. — Fermentation en milieu neutre.

Devant ces résultats négatifs nous avons pensé qu'il fallait remédier à l'acidité du milieu. Nous avons donc préparé un moût de bière neutralisé par une solution diluée de soude à pH 7,4 et tamponné ensuite après addition de 0,2 % de phosphate disodique. L'acide iodacétique était ajouté sous forme d'iodacétate de Na. A la fin de la fermentation, le moût avait encore un pH de 6,8 à 7,1.

Pour arrêter la fermentation dans ce milieu neutralisé, il nous a fallu une bien plus forte concentration d'antiseptique qu'en milieu acide, conformément à tous les résultats acquis. L'arrêt total de la fermentation déjà bien affaiblie

par une concentration de M/800 d'acide iodacétique, n'est définitif qu'à M/200.

Le tableau XX nous montre que même en milieu neutre, le glutathion ne réactive pas l'inhibition exercée par l'acide iodacétique.

Tableau XX

*Influence du GSH ajouté à un moût neutralisé dont la fermentation est inhibée par l'acide monoiodacétique
Levure Cramant*

		TÉMOINS		CH ₂ ICOOH M/400			CH ₂ ICOOH M/800		
		1	2	3	4	5	6	7	8
CH ₂ ICOOH		0	0	+	+	+	+	+	+
GSH 2 équiv. ajoutés après	0 h.		+		+			+	
	18 h.					+			+
Alcool formé		341	350	36,4	34,1	37,2	23,1	31	24
Poids sec formé		28,3	27,6	17,8	15	—	12	15,2	12,8

Alcool et poids sec formés à la fin de la fermentation de chaque tube, exprimés en mg..

Le moût de bière est neutralisé à pH 7,45.

8,6 mg. de poids sec de levure sontensemencées dans chaque tube.

Il est donc démontré que le glutathion, tant qu'il est en présence d'acide iodacétique, n'agit sur la levure ni par pénétration ni autrement, en la rendant plus résistante envers l'antiseptique.

Il est curieux de constater que même en milieu neutre, le glutathion ne se combine pas avec l'acide iodacétique, ce dernier gardant son entière aptitude inhibitrice.

A la lumière de ces faits on conçoit difficilement que l'acide iodacétique se combine avec plus de facilité au glutathion de l'intérieur de la cellule, plutôt que de se combiner avec le glutathion qui se trouve dans le moût, en son voisinage immédiat.

Il est donc probable que l'action de l'acide à l'intérieur de la cellule, doit porter sur d'autres corps que le glutathion, peut-être sur les protéines sulfhydrilées diastatiques.

Quatrième série. — L'addition du glutathion a lieu après l'élimination de l'acide iodacétique.

La séparation de la levure de son milieu de culture se fait par centrifugation.

Pour mener stérilement cette opération, les essais de fermentation ont été faits sur 10 cc. de moût de bière introduits dans des tubes à centrifugeuse.

Nous avons éliminé le milieu contenant l'acide iodacétique après le temps de contact voulu et lavé le dépôt de levure avec du tampon stérile.

Le dépôt de levure est ensuite mis en suspension dans 10 cc. du même moût de bière. Les levures ainsi traitées retrouvent intégralement leur pouvoir fermentatif normal, mais après un certain temps de latence, qui augmente avec la concentration de l'antiseptique et le temps d'incubation.

La fermentation de ces levures s'arrête après un temps

variable de 5 à 7 jours, après avoir produit de l'alcool et du poids sec en quantité presque égales au témoin. Pourtant, lorsque la concentration d'acide s'élève à $M/500$ et le temps d'incubation à 18 heures, la fermentation ne marche plus que très lentement et ne finit qu'après 10 jours (tableau XXI).

Il a fallu employer des concentrations de $M/500$ pendant 24 heures pour tuer complètement la levure.

Dans les mêmes conditions, le glutathion ajouté à raison d'une concentration moléculaire double de celle de l'acide inhibiteur, ne modifie en rien le temps de latence, ni le résultat final de la fermentation (tableau XXI).

Nous avons enfin ajouté au dépôt de levures intoxiquées par un contact de 18 heures avec l'acide iodacétique, 10 cc. d'un milieu stérile saccharosé.

Ce milieu contenait 150 g. de saccharose, 3 g. de phosphate d'ammonium et 1 g. de SO_4Mg pour 1 litre d'eau distillée.

La levure qui avait subi le contact de l'acide iodacétique pouvait très bien faire fermenter ce milieu.

Cinquième série. — Le glutathion est ajouté à des levures accoutumées.

Nous avons fait des essais de fermentation avec la levure Dortmund accoutumée à $M/1.500$ d'acide iodacétique et la levure Cramant accoutumée à $M/1.000$ du même corps.

Si le glutathion est ajouté en même temps que l'acide, il n'y a aucun changement dans la marche de la fermentation.

La levure accoutumée est ensuiteensemencée dans du moût simple, additionné ou non de glutathion. Les courbes représentant la marche de la fermentation sont à peu près superposables.

Tableau XXI
Influence du GSH ajouté après l'élimination du CH_2ICOOH
Levure Cramant; moût de bière : pH 5,8

	TÉMOIN		CH_2ICOOH M/4.000				CH_2ICOOH M/1.500			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CH_2ICOOH Temps de contact avec										
6 h.	0	0	+	+			+	+		
18 h.	0	0			+	+			+	+
GSH ajouté après l'élimination du CH_2I		+		+		+		+		+
Alcool formé en 48 h.	88	79,5	74	81	26	28	15	18	0	0
Alcool formé à la fin de la fermentation	252	244	254	239	208	221	189	201	222x	214x
Poids sec formé à la fin de la fermentation	43	44,1	39,7	—	30,7	31	29,6	—	29x	28,3x

Ensemencé 11,5 mg. de poids sec dans chaque tube.

x Résultats après 10 jours.



De ces dernières expériences, il ressort que l'on ne peut renverser, par le glutathion, l'effet inhibiteur de l'acide monoiodacétique.

La fermentation qui reprend en milieu pur est probablement provoquée par le développement des cellules ayant résisté à l'action de l'antiseptique, car, on l'a déjà vu, ce dernier agit sélectivement sur les levures. Il demeure donc évident, que l'on ne peut annihiler l'inhibition due aux acides monohalogénés sur l'activité de la levure, par des additions de glutathion.

CHAPITRE VI

SUC DE LEVURE LEBEDEFF :

FERMENTATION INHIBÉE PAR L'ACIDE

MONOIODACÉTIQUE

ESSAIS DE RÉACTIVATION PAR LE GLUTATHION

Pour éliminer toute objection concernant la pénétration des substances à travers la membrane cellulaire, nous avons étendu nos recherches à la fermentation zymasique (*) (126).

(*) Une partie du travail sur la fermentation zymasique a été faite en collaboration avec M. E. Haag (126) qui a en outre, aimablement mis à notre disposition la levure sèche nécessaire à l'obtention du suc de macération,

La préparation du suc de levure a été indiquée à la page 59. On a suivi la marche de la fermentation par le dosage du gaz carbonique au moyen de l'appareil de Harden, Thompson et Young (127); la précision du dosage est de 1 p. cent. Tous nos essais ont été faits à 25°, sur 10 cc. de liquide, dont la moitié était représentée par le suc. On y ajoute du glucose à raison de 400 mg. par tube. On introduit d'abord dans le tube 5 cc. de suc auquel on ajoute la quantité nécessaire d'eau distillée, l'acide iodacétique et environ dix minutes après, la solution de glucose, en notant rigoureusement cet instant.

Expérience en milieu acide. — Nous avons commencé par déterminer l'influence des quantités croissantes d'acide monoiodacétique sur l'inhibition de la fermentation zymasique, pendant une durée d'expérience de trois heures. Les résultats exposés dans le tableau XXII n'ont pas une valeur absolue, mais peuvent être comparés entre eux. Ici les conditions d'expériences sont toutefois plus précises que dans le cas des levures vivantes et des milieux de culture.

Tableau XXII

*Influence de la concentration de CH_2ICOOH
sur l'inhibition de la fermentation zymasique
en milieu acide*

CH_2ICOOH		Inhibition %
mg.	conc. mol.	
0,037	M/50.000	1
0,186	M/10.000	7
0,372	M/5.000	30
0,537	M/3.460	72
0,620	M/3.000	81
0,744	M/2.500	88
0,930	M/2.000	95
1,24	M/1.500	100

Durée 3 heures.

Nous avons observé que le temps de contact entre le zymase et l'acide monoiodacétique avant l'addition du glucose, augmentait son action inhibitrice. Par exemple, pour une concentration de M/10.000 d'antiseptique, l'inhibition qui est de 7,4 % pour un temps de contact de dix minutes environ, s'élève à 18,9 % pour un contact de 15 h. 40.

Il s'agissait de savoir ensuite si l'inhibition de la production de CO_2 , correspondait à une baisse de la teneur en substances sulfhydrilées. Nous avons alors dosé ces substances dans le suc frais, et l'expérience terminée, dans les

liquides soumis à l'essai (*). Les résultats (tableau XXIII) indiquent nettement que l'acide monoiodacétique, à des concentrations qui inhibent fortement l'action de la zymase, ne provoque aucune diminution de la teneur en glutathion du suc.

Malgré ces résultats, nous avons tenté de réactiver une fermentation arrêtée par l'acide iodacétique, au moyen d'une addition de glutathion.

Comme nous nous y attendions, l'addition du glutathion ne provoqua aucun amoindrissement de l'inhibition. Les dosages de glutathion confirmèrent d'autre part que l'acide iodacétique n'exerce aucune influence sur la teneur en glutathion, du moins en milieu acide. Le glutathion ajouté a été intégralement retrouvé (tableau XXIV). L'excès d'I absorbé correspond exactement à la quantité de glutathion ajouté.

(*) Nous avons indiqué à la page 60 la manière dont nous avons déterminé le glutathion et la totalité des substances précipitables par le lactate de Cd sans défécation préalable. Les résultats sont exprimés en cc. d'iode M/500 absorbé, correspondant à 5 cc. de suc de levure. Au moins 75 % des chiffres ainsi obtenus sont attribuables à l'action de l'iode sur le glutathion.

Tableau XXIII
Action du CH_2ICOOH sur la fermentation zymasique en milieu acide

	CH_2ICOOH		Inhibition %	I_2 N/500 absorbé cc.	I_2 N/500 absorbé après réduct. p. CNK
	mg.	conc. mol.			
Suc frais	0	—	—	39,2	46,7
	0	—	—	38,9	45,6
	0,537	M/3.460	72	38,3	49,2
	0,744	M/2.500	88	38,9	49
	1,2	M/1.500	100	38,9	47,5
Suc frais	0		—	39,6	46,3
	0		—	37	—
	0,620	M/3.000	81	37,2	44

Tableau XXIV
Influence du GSH ajouté à la fermentation zymasique inhibée par le CH₂ICOOH

	CH ₂ ICOOH		GSH ajouté mg.	Inhibition %	I ₂ N/500 absorbé cc.	I ₂ N/500 absorbé après réduction par CNK
	mg.	conc. mol.				
Suc frais	0	—	0	—	39,6	46,3
	0	—	0	—	38,7	—
	0,62	M/3.000	0	81	37,1	47,0
	0,62	M/3.000	1,03	80	37,5	47,5
	0,62	M/3.000	10,3	82	54,3	64,0

Expériences en milieu neutre. — Pour rendre le milieu neutre, nous avons ajouté dans nos tubes, un excès de CO_3Mg . Cependant on a vu que la fermentation zymasique n'était pas compatible avec une trop grande quantité de ce sel et qu'il fallait choisir une dose sans action gênante sur la fermentation et capable de maintenir quand même le milieu à pH 6,8. Ces conditions sont satisfaites avec 50 à 100 mg. de CO_3Mg . D'autre part, la période de latence est notablement plus grande en présence de CO_3Mg , qu'en son absence. De nombreuses expériences nous ont montré que pour inhiber, au moyen de l'acide monoiodacétique, la fermentation zymasique en milieu tamponné par 80 mg. de CO_3Mg , il fallait beaucoup plus d'antiseptique que pour les essais en milieu acide. On se souvient des remarques de Rapkine (54) et de Ehrenfest (30) qui attribuent l'affaiblissement de l'inhibition avec l'augmentation du pH, au rôle probable du pH sur la modification de la perméabilité de la membrane cellulaire.

Cette hypothèse est peut-être exacte, mais d'après nos expériences, il est évident que la réaction du milieu agit aussi d'une autre manière sur l'inhibition par l'acide monoiodacétique, de la fermentation zymasique.

Dans ces nouvelles conditions, la présence d'acide ioda-cétique entraîne une certaine baisse d'iode absorbé. Cette diminution est néanmoins trop faible pour pouvoir expliquer l'inhibition presque totale de la fermentation (tableau XXV).

Tableau XXV

***Influence du CH_2ICOOH sur la fermentation zymasique
en milieu neutre***

CH_2ICOOH		cc. CO_2 dégagé apr. 18 h. 50	Inhibition %	I_2 N/500 absorbé cc.
mg.	conc. mol.			
O	—	69,1	O	42
2,06	M/900	6,1	91	28,3
4,13	M/450	5,3	92	33,9
6,19	M/300	2,2	97	30
O	—		O	39
4,65	M/400		88	31

80 mg. CO_3Mg par 10 cc. de liquide en fermentation.

Après nous être assurée que des additions croissantes de glutathion seul, de 4 à 25 mg. par essai, n'influençaient en aucune manière la marche de la fermentation et qu'à la fin de la fermentation on retrouvait intégralement les quantités ajoutées, nous avons étudié à nouveau le comportement de la fermentation en présence simultanée d'acide et de glutathion. Cette fois encore le glutathion n'a provoqué aucun renversement de l'inhibition (tableau XXIV).

Tableau XXVI

*Influence du GSH ajouté à la fermentation zymasique
en milieu neutre, inhibée par le CH_2ICOOH*

	CH_2ICOOH M/400	GSH ajouté mg.	CO_2 dégagé après :				I_2 N/500 absorbé cc.
			20'	3 h.	6 h.	9 h.	
Suc frais	O	O					30,0
	O	O	1,7	43,7	56,5	62,9	—
	4,65 mg.	O	1,5	2,3	2,4	2,4	31,0
	4,65	7,67	1,4	2,3	2,6	2,6	42,0
	4,65	76,7	1,4	2,4	2,4	2,4	165,5

CO_3Mg : 80 mg. par 10 cc.

Milieu légèrement alcalin. — Nous avons enfin repris nos expériences avec un milieu légèrement alcalinisé. Le suc de levure a été neutralisé par une solution de soude et tamponné par 100 mg. de phosphate disodique. Confirmant l'essai en présence de CO_3Mg , l'acide iodacétique inhibe beaucoup moins la fermentation dans ce milieu faiblement alcalin qu'en milieu acide. On remarque cette fois une diminution sensible d'iode absorbé (tableau XXVII).

Tableau XXVII

*Influence du CH_2ICOOH sur la fermentation zymasique
en milieu légèrement alcalin*

	CH_2ICOOH		CO_2 après 20 h.	Inhibition %	I_2 N/500 absorbé cc.	I_2 N/500 absorbé après réduction par CNK
	mg.	conc. mol.				
Suc frais.	O	—	69,1	—	42,0	48,1
	O	—	64,8	—	43,5	47,9
	3,98	M/470	41,3	36	32,6	39,3
	13,29	M/140	O	100	19,9	23,0

101,1 mg. de phosphate dissodique par 10 cc.

L'addition de glutathion à ce milieu légèrement alcalin provoque l'effet suivant : une légère réactivation est perceptible cette fois-ci, mais reste bien loin de rétablir le pouvoir initial de la fermentation.

Elle atteint, après un temps assez long il est vrai, 7,5 % pour une concentration M/266 d'acide iodacétique et 25 % pour une concentration M/145.

Une quantité considérable de glutathion disparaît (tableau XXVIII).

Tableau XXVIII

Influence du GSH ajouté à la fermentation zymasique en milieu légèrement alcalin, inhibée par le CH_2ICOOH

	CH_2ICOOH		GSH ajouté	cc. de CO_2 après :		Réactivat %	I M/500 absorbé
	mg.	conc. mol.					
Suc frais	—	—	—	5 h. 10'	22 h. 45'	—	36
A	0	—	0	46,5	70,1	—	35,9
	7,00	—	0	0,3	0,9	—	16,6
	7,00	M/266	11,6	0,0	4,6	6,6	34,6
	7,00	—	58,0	0,0	5,2	7,5	85,7
B	0	—	0	4 h. 30'	29 h. 45'	—	
	4,5	—	0	34,5	66,0	—	
	4,5	M/415	10	0,0	1,1	—	
	4,5	—	50	0,0	14,5	22	
					16,7	25	

Série A contenait 101,1 mg. de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H} + 12 \text{H}_2\text{O}$ par tube.

Série B contenait 54,5 mg. de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H} + 12 \text{H}_2\text{O}$ par tube.

*
**

On pourrait expliquer la légère réactivation obtenue par le glutathion en milieu faiblement alcalin, par le blocage d'une partie de l'acide monoiodacétique, par ce glutathion.

Si ceci est vrai, une solution préalablement préparée d'un mélange équimoléculaire d'acide iodacétique et de glutathion ne devrait plus arrêter la fermentation. Nous avons donc préparé une solution contenant 55,8 mg. d'acide iodacétique neutralisé et 92,04 mg. de glutathion dans 25 cc. d'eau distillée (solution A) et suivi la marche de l'interréaction de ces deux corps par la réaction au nitroprussiate.

La disparition du glutathion, rapide au début, s'est arrêtée 8 heures plus tard; 24 heures après, la réaction au nitroprussiate donnait encore une légère coloration rose.

Le mélange A exerce une action inhibitrice sur la fermentation zymasique. Toutefois, il est moins actif que l'acide iodacétique seul agissant à des concentrations identiques.

Il est donc probable que la réaction entre le GSH et le CH_2ICOOH n'ayant pas été complète, l'action inhibitrice a été exercée par l'acide resté libre.

Nous avons répété les essais de fermentation en nous servant cette fois de la méthode de Warburg.

Le volume de liquide mis en œuvre est de 2 cc. au lieu de 10 cc. comme précédemment, toutes choses étant égales d'ailleurs. Une première série d'essais nous a confirmé, en même temps que la marche régulière de la méthode, l'inhibition provoquée par différentes concentrations d'acide iodacétique. (Tableau XXIX, courbes IX, III, IV, X et XII.)

Un mélange a été fait, contenant 37,2 mg. de CH_2ICOOH neutralisé et 61,4 mg. de glutathion dans 25 cc. d'eau distillée (mélange B) et après 4 heures nous l'avons soumis à l'expérience.

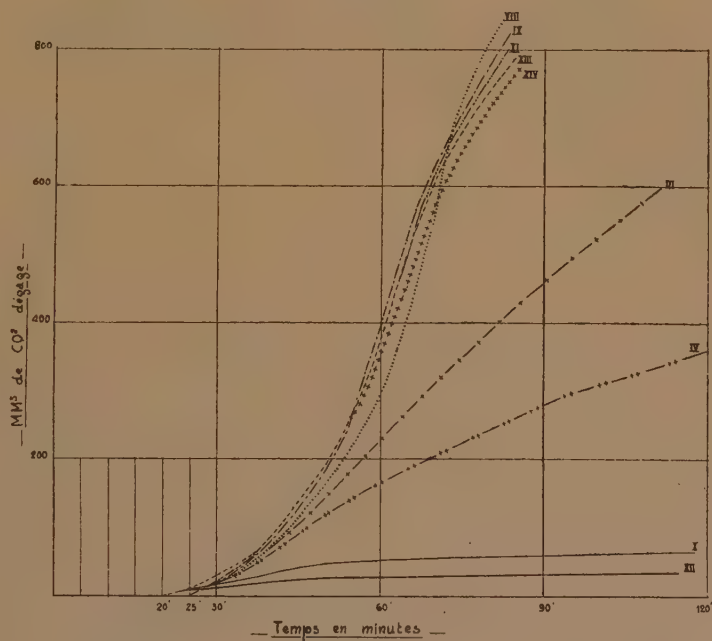
Le tableau XXX indique que le mélange B exerce une inhibition croissante avec l'augmentation de la quantité ajoutée; néanmoins, dans chaque cas, l'inhibition constatée reste nettement inférieure à celle provoquée par des concentrations équivalentes d'acide iodacétique pur, préalablement neutralisé.

Il est donc certain, que la solution B contient une certaine quantité d'acide libre qui agit comme tel.

Enfin nous avons préparé un mélange contenant dans 25 cc. d'eau, 37,2 mg. de CH_2ICOOH et 65 mg. de GSH (léger

TABLEAU XXIX

Courbes indiquant l'influence du CH_3ICOOH et d'un mélange préalable de cet acide avec du GSH sur la fermentation zymasique.

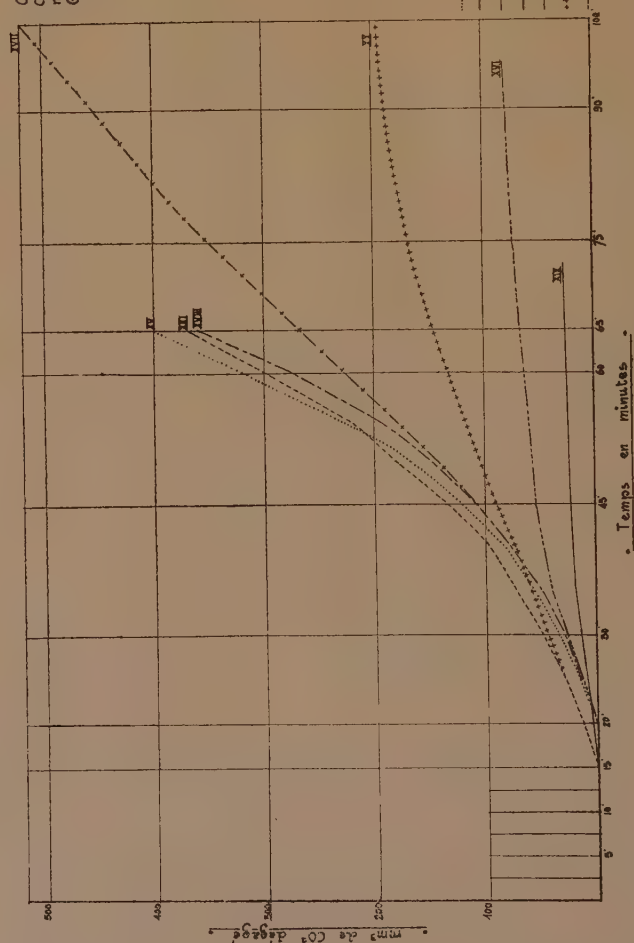


LEGENDE.

- VII TEMOIN AVEC SUC LEBEREMENT ALCALINISÉ
- IX TEMOIN
- - - - - X M/2500 CH_3ICOOH
- XI M/2500 CH_3ICOOH EN MELANGE C
- XII M/1250 CH_3ICOOH
- XIII M/1250 CH_3ICOOH EN MELANGE C
- + + + + + XIV GSH M/1250
- - - - - III M/5000 CH_3ICOOH
- - - - - IV M/5000 CH_3ICOOH

TABLEAU XXX

Courbes indiquant l'influence du CH_3COOH et d'un mélange équimoléculaire de CH_3COOH et de $\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$ sur la fermentation glycolytique.



LÉGENDE.

- XVII M/2500 CH_3COOH
 XVI M/2500 CH_3COOH EN MÉLANGE D
 M/500 CH_3COOH EN MÉLANGE C
 XII M/250 CH_3COOH
 II M/250 CH_3COOH EN MÉLANGE D
 XIII 65H M/1250

excès), neutralisé au fur et à mesure de son acidification (libération de HI) par une solution étendue de NaOH.

Après 20 heures, la solution restée alcaline au papier de tournesol, était censée ne contenir que le thioéther inactif $\text{CH}_2\text{GS-COOH}$, du INa, et un léger excès de GSH; soit des corps inactifs à faible concentration (solution C).

A cause de cette solution légèrement alcaline, nous avons fait un essai témoin contenant la même quantité de soude. La fermentation de ce témoin fut absolument normale (tableau XXIX, courbes VIII et IX). Nous avons finalement dans nos récipients d'expérience une quantité de mélange qui correspondait à M/1.250 et M/2.500 d'acide iodacétique.

Les courbes XI, XIII du tableau XXIX et la courbe XVIII du tableau XXX, résument les résultats de cette expérience.

Cette fois-ci, le mélange préalable d'acide iodacétique et de glutathion n'a pas inhibé la fermentation.

Il est donc probable que dans les expériences précédentes, la réaction entre le GSH et l'acide monoiodacétique n'avait pas été complète.

Cette dernière expérience confirme que le thioéther $\text{CH}_2\text{GS-COOH}$ est absolument inactif et que l'on peut supprimer ou amoindrir l'action toxique de l'acide monoiodacétique, par sa combinaison plus ou moins complète avec le glutathion.

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

L'inhibition des processus de dégradation glucidique par les acides acétiques monohalogénés serait causée, suivant certains auteurs, par l'action de ces acides sur les composés sulfhydrilés, parmi lesquels le glutathion qui est toujours présent en quantités appréciables dans les cellules vivantes.

Si cette hypothèse était exacte, elle aurait l'avantage d'apporter une explication définitive du mécanisme de l'action antiseptique des acides halogénés, en même temps qu'une contribution importante à l'étude du rôle joué par le glutathion dans l'organisme vivant.

Toutes nos expériences ont porté sur trois races de levures: Dortmund, Cramant et Springer, provenant de la collection de l'Institut Pasteur, choisies de manière à avoir trois types différents et bien définis, et sur le suc de levure Lebedeff, préparé à partir de la levure basse de la Brasserie Demory.

Nous avons utilisé les acides monoiodacétique, monobromacétique et monochloracétique.

1° La concentration en acide monohalogéné nécessaire, aussi bien à l'arrêt de la fermentation qu'à la croissance de la levure, peut être exactement déterminée, si l'on opère dans des conditions invariables; elle dépend de la nature de l'acide halogéné, de la race et de la quantité de levure ensemencée, de la nature du milieu de culture et du pH.

2° On peut arriver à habituer les levures à des concen-

trations d'acide halogéné de 4 à 8 fois plus fortes que la concentration initiale d'antiseptique qui arrête la fermentation de la levure. L'accoutumance se fait par sélection. Une levure accoutumée à l'un des acides halogénés l'est aussi bien pour les deux autres.

3° La fermentation et la croissance des levures accoutumées sont lentes en présence des acides halogénés, mais si ces mêmes levures sont cultivées dans un milieu ordinaire, elle retrouvent toute leur activité normale.

Aucune relation stable n'a pu être mise en évidence entre le degré d'accoutumance et la quantité de sucre consommé. Le rapport entre le sucre disparu et l'alcool formé étant toujours voisin du nombre théorique, il ne semble pas y avoir un changement qualitatif dans le bilan de la fermentation.

4° Les pouvoirs fermentatifs et respiratoires des levures normales et accoutumées ont été mesurés avec précision par l'appareil de Warburg.

Au delà d'une certaine concentration de l'antiseptique, toutes les levures accoutumées présentent une forte diminution du pouvoir ferment ainsi que du pouvoir respiratoire. La fermentation aérobie est la plus touchée, ensuite la fermentation anaérobie et un peu moins la respiration. Le quotient d'oxydation de Meyerhof reste sensiblement voisin de la normale. Les levures accoutumées réensemencées en milieu normal retrouvent entièrement leurs facultés primitives.

5° Le taux de glutathion de la levure normale, qui s'élève à 800 mg. par 100 g. de poids sec, est constant dans des conditions identiques, et varie avec la race, le milieu et la méthode de culture.

Les acides monohalogénés provoquent dans les levures

normales une disparition de glutathion, disparition qui augmente avec la concentration de l'acide.

Les levures accoutumées aux acides monohalogénés présentent un taux de glutathion fortement diminué par rapport aux levures normales, diminution qui reste sans aucun rapport défini soit avec la concentration d'antiseptique, soit avec le degré d'inhibition de la fermentation. Ce taux ne varie pas, même lorsque l'on cultive à nouveau ces levures sur des milieux additionnés d'acides halogénés.

Les levures accoutumées cultivées pendant une génération dans un milieu ordinaire, retrouvent leur taux de glutathion primitif, même très légèrement accru, de 8 à 10 p. cent.

L'accoutumance n'a pas mis en évidence un changement profond dans la production du glutathion par la levure.

6° L'hypothèse envisagée est basée sur la réaction entre l'acide monohalogéné et le glutathion, d'après la formule :



Il fallait donc suivre cette réaction par le dosage des hydrides halogénés produits.

L'hydrolyse des solutions de l'acide monobromacétique et surtout de l'acide monoiodacétique rend impossible une juste discrimination entre les ions halogénés libérés par l'hydrolyse et ceux libérés par la réaction avec le glutathion. Nous n'avons donc dosé que le Cl^- provenant de l'acide monochloracétique.

Il y a, d'une manière très nette, une apparition de Cl^- dans la levure et dans le milieu de culture. La proportion d'acide combiné — calculée à partir du Cl^- libéré — pour provoquer l'inhibition, ne dépasse pas 3 % de la quantité totale mise en œuvre.

L'inhibition de la fermentation est complète, même lorsqu'une forte proportion de GSH reste encore intacte. La

fermentation zymasique en milieu légèrement acide peut être arrêtée sans aucune perte de glutathion.

Le rapport entre le GSH disparu et le Cl^- apparu est stoechiométrique, 6,85, seulement dans du suc de levure neutralisé. Ce même rapport étant nul pour la levure accoutumée et variant de 1,5 à 2,9 pour les levures normales, il est probable que les levures normales et à plus forte raison les levures accoutumées, continuent à produire du glutathion même en présence de l'acide chloracétique.

7° Nous avons tenté de réactiver une fermentation arrêtée par des acides halogénés, au moyen d'addition de glutathion.

Le glutathion a été ajouté après avoir laissé un certain temps la levure au contact de l'acide monoiodacétique, ou bien ajouté au même moment que l'antiseptique. L'addition de glutathion ne provoque pas de réactivation ni en milieu acide ni en milieu neutre.

Enfin nous avons éliminé par centrifugation le milieu contenant l'antiseptique et mis la levure en suspension dans du moût pur, ou dans une solution minérale saccharosée. Cette levure provoque la fermentation de ces deux milieux, sans aucune addition de glutathion.

8° Des expériences semblables ont été poursuivies avec le suc de levure Lebedeff. Les concentrations d'acide monoiodacétique qui arrêtent la fermentation zymasique sont du même ordre de grandeur que celles qui arrêtent la fermentation par la levure vivante.

Son pouvoir inhibiteur décroît lorsque la réaction du milieu dérive vers l'alcalinité. L'acide monoiodacétique ne provoque aucune disparition du glutathion présent dans le suc lorsqu'on opère en milieu acide; mais il entraîne une légère perte en milieu neutre, perte qui s'accroît sensiblement en milieu faiblement alcalin.

Conformément à ces résultats, des additions croissantes de glutathion ne réussissent pas à réactiver la fermentation inhibée, si ce n'est que très légèrement en milieu faiblement alcalin.

9° Une solution d'acide iodacétique, dont l'effet a été préalablement neutralisé par une quantité équivalente de glutathion, produit une inhibition plus ou moins grande, suivant que la réaction entre les deux corps a été totale ou plus ou moins complète. Si la réaction est totale, dans les conditions de concentration présente, les corps produits : le thioéther et HI n'exercent aucune inhibition, tout au moins pendant la durée de l'expérience.

*
**

Les substances intracellulaires, de la levure, capables de réagir avec les acides halogénés sont : le glutathion, les protéines sulfhydrilées et les composés possédant la fonction amine.

Nos expériences ont montré que si les acides halogénés se combinent au glutathion existant dans les levures, on ne peut pas attribuer à cette combinaison, leur action inhibitrice sur la fermentation alcoolique.

Les récents travaux de Hopkins et de Rapkine ont révélé l'extrême importance des groupements sulfhydrilés protéiniques dans l'activité de certaines enzymes qui ont un rôle dans le métabolisme glucidique; d'autre part, on sait que les acides halogénés peuvent très bien se combiner irréversiblement aux groupements -SH fixes liés aux protéines.

Malheureusement on ne connaît pas la cinétique de la réaction des -SH protéiniques avec les acides halogénés, en fonction de la réaction du milieu.

Il est toutefois probable que le pH exerce dans ce cas la même influence que dans le cas de la réaction entre le GSH et les acides halogénés.

La proportion des enzymes sulfhydrilées est certainement minime par rapport à la quantité de glutathion contenu dans la levure.

A un pH faiblement acide, tel qu'on peut le constater dans le suc de Lebedeff, la réaction entre l'acide halogéné et tous les groupements -SH est très lente; mais étant donné la très faible proportion des enzymes thiolés, on peut concevoir que ces enzymes soient touchées par l'acide avant que l'on ne puisse observer une certaine diminution de glutathion.

A l'intérieur des cellules, où le pH se rapproche probablement de la neutralité, on constate toujours au moment de l'inhibition une forte diminution de glutathion.

Plus les conditions sont favorables à la combinaison du GSH avec l'acide halogéné, plus le glutathion diminue et la dose d'antiseptique nécessaire à l'arrêt de la fermentation augmente d'autant.

Nous pensons comme Lohman (61) que le glutathion en se combinant avec l'acide halogéné pour donner un thio-éther inactif, peut détourner une partie de cet antiseptique de son action inhibitrice.

D'après les derniers travaux connus, il semble que l'action antiseptique des acides monohalogénés porte sur les enzymes sulfhydrilées responsables de l'oxydo-réduction des triosephosphates aboutissant à l'acide glycérique phosphorylé.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) DUCLAUX. — *Traité de Microbiologie*, 1898. Etude des antiseptiques. Vol. III, chap. XXIV.
- (2) LAFAR. — *Technische Mykologie*, 1905-1907. Wirkung einiger technischer wichtiger chemischer Einflüsse auf die Hefen. Vol. II, chap. VI.
- (3) MIQUEL et CAMBIER. — *Traité de Bactériologie pure et appliquée à la Médecine et à l'Hygiène*. Naud, Paris, 1902.
- (4) GENEVOIS. — Sur les substances capables d'arrêter la fermentation alcoolique. *Ann. des Ferm.*, t. 1, 1935, p. 86.
- (5) DUCLAUX. — *Traité de Microbiologie*, 1898. Vol. III, chap. XXVII.
- (6) KOSSIAKOFF. — De la propriété que possèdent les microbes de s'accomoder aux milieux antiseptiques. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 1, 1887, p. 465.
- (7) EFFRONT. — Contribution à l'étude de l'acclimation des levures aux antiseptiques. *Moniteur Scientifique*, 1905, p. 19.
- (8) EFFRONT (J.). — L'acclimatation de la levure de bière à l'arsenic. *C. R. Soc. Biol.*, t. 83, 1920, p. 806.
- (9) RICHET (C.), BACHRACH (E.) et CARDOT (H.). — Les phénomènes d'anaphylaxie chez les microbes. *C. R. Acad. Sciences*, t. 172, 1921, p. 512.
- (10) RICHET (C.), BACHRACH (E.) et CARDOT (H.). — L'acoutumance du ferment lactique aux poisons (spécificité,

- simultanéité, alternance). *C. R. Ac. Sciences*, t. **174**, 1922, p. 345.
- (11) RICHET (C.), BACHRACH (E.) et CARDOT (H.). — De la simultanéité de deux effets toxiques contradictoires (accoutumance et anapylaxie) sur la même cellule. *C. R. Ac. Sciences*, t. **178**, 1924, p. 535.
- (12) CARDOT (H.) et LAUGIER (H.). — Adaptation, transmission des caractères acquis, sélection par concurrence vitale chez les ferments lactiques. *C. R. Ac. Science*, t. **176**, p. 1087.
- (13) CARDOT (H.) et LAUGIER (H.). — Contribution à l'étude de l'accoutumance, de la sélection et de la transmission des caractères acquis chez les microbes. *Ann. Physiol. et Physico-Chim. Biol.*, t. **1**, 1925, p. 105.
- (14) PETT (L.-B.). — Lactoflavin in Micro-Oorganism. *Biochem. Journ.*, t. **29**, 1935, p. 937.
- PETT (L.-B.). — Studies on yeast grown in cyanide. *Biochem. Journ.*, t. **30**, 1936, p. 1438.
- (15) POHL (J.). — Zur Lehre von der Wirkung substituirter Fettsäure. *Archv. f. exper. Pathol. und Pharmakologie*, t. **24**, 1888, p. 124.
- (16) ROSENBLATT et ROZENBAND. — Sur l'influence paralysante exercée par certains acides sur la fermentation alcoolique. *C. R. Ac. Sciences*, t. **149**, 1909, p. 309.
- (17) SCHWARTZ et OSCHMANN. — Le taux de l'acide lactique musculaire dans les concentrations des animaux empoisonnés par l'acide monobromacétique. *C. R. Soc. de Biol.*, t. **91**, 1924, p. 275 et t. **92**, 1925, p. 169.
- (18) LUNDSGAARD (E.). — Untersuchungen über Muskelkontraktionen ohne Milchsäurebildung. *Biochem. Zeit.*, t. **127**, 1930, p. 162.
- (19) LUNDSGAARD (E.). — Die Monojodessigsäurewirkung

auf die enzymatische Kohlenhydratspaltung. *Biochem. Zeit.*, t. **220**, 1930, p. 1.

LUNDGAARD (E.). — Über die Einwirkung der Monojodessigsäure auf den Spaltungs- und Oxydationsstoffwechsel. *Biochem. Zeit.*, t. **220**, 1930, p. 8.

- (20) GENEVOIS (L.) et CAYROL (P.). — Inhibition spécifique de la fermentation alcoolique des cellules de levure sans arrêt ni de la respiration ni de la réaction Pasteur-Meyerhof, ni de la croissance. *C. R. Ac. Sciences*, t. **192**, 1931, p. 1494.

— Sur les rapports entre fermentation et respiration chez les levures. *Ann. des Ferm.*, t. **1**, 1935, p. 361.

- (21) YAMASAKI. — Über die Wirkung von monojodessigsäure Natrium auf die Teilfermente der Zymase und die Vergärung von Hexose-diphosphat. *Biochem. Zeit.*, t. **228**, 1930, p. 123.

- (22) MAC FARLANE (M.-G.). — Fermentations by yeast Preparations. *Biochem. Journ.*, t. **25**, 1931, p. 822.

- (23) KREBS. — Über die Wirkung der Monojodessigsäure auf den Zellstoffwechsel. *Biochem. Zeit.*, t. **234**, 1931, p. 278.

- (24) NILSSON, Zeile und von Euler. — Zur Kenntnis des Monojod- und Monobromessigsäurevergiftung beim Kohlenhydratabbau. *Zeit. für Physiol. Chemie*, t. **194**, 1931, p. 53.

- (25) BOYSEN JENSEN. — Die Einwirkung der Monojodessigsäure auf Atmung und Gärung. *Biochem. Zeit.*, t. **236**, 1931, p. 211.

- (26) LOHMANN. — Untersuchungen über die Vergiftung von Froschmuskelextract mit Monojodacetat. *Biochem. Zeit.*, t. **236**, 1931, p. 444.

- (27) BARRENSCHEEN et BRAUN (K.). — Untersuchungen über

die Glycolyse des Blutes. II Die Hemmung der Glykolyse. *Biochem. Zeit.*, t. **231**, 1931, p. 144.

BARRENSCHEEN, BRAUN (K.) et DREGUSS. — Glykolysehemmung und Methylglyoxalanhäufung. *Biochem. Zeit.*, t. **232**, 1931, p. 165.

(28) DUDLEY (H.-W.). — Intermediary carbohydrate metabolism. The effect of sodium-iodacetate on glyoxalase. *Biochem. Journ.*, t. **25**, 1931, p. 439.

(29) LUNDGAARD. — Weitere Untersuchungen über die Einwirkung der Halogenessigsäure auf den Spaltungs- und Oxydationsstoffwechsel. *Biochem. Zeit.*, t. **250**, 1932, p. 61.

(30) EHRENFEST (E.). — The influence of Monoiodacetate on oxidation and fermentation by yeast. *J. Biol. Chem.*, t. **97**, 1932, p. 77.

(31) MEYERHOF (O.) et BOYLAND (E.). — Ueber den Atmungsvorgang odessigsäurevergifteter Muskel. *Biochem. Zeit.*, t. **237**, 1931, p. 406.

(32) QUASTEL (J.-H.) et WHEATLEY (A.). — Oxidations by brain. *Biochem. Journ.*, t. **26**, 1932, p. 725.

(33) EMBDEN (G.) et DEUTICKE (H.-J.). — Ueber die Einwirkung von Fluorid und Bromessigsäure auf die Intermediärvorgänge bei der Glycolyse in der Muskulatur. *Zeit. f. Physiol. Chem.*, t. **230**, 1934, p. 50.

(34) MEYERHOF (O.), OHLMEYER (P.) et MÖHLE (W.). — Über die Koppelung zwischen Oxydoreduktion und Phosphatveresterung bei der anaeroben Kohlenhydratspaltung. *Biochem. Zeit.*, t. **297**, 1938, p. 90.

(35) PARNAS (J.-K.). — Über die Enzymatische Phosphorylierungen in der alkoholischen Gärung und in der Muskelglykogenolyse. *Enzymol.*, t. **5**, 1938, p. 166.

- (36) HOPKINS, MORGAN. — The influence of thiol-groups in the activity of dehydrogenase. *Biochem. Journ.*, t. **32**, 1938, p. 611.

HOPKINS, MORGAN et LUTWAK-MANN. — The influence of thiolgroups in the activity of dehydrogenase. *Biochem. Journ.*, t. **32**, 1938, p. 1829.

- (37) GREEN, NEEDHAM et DEWAN. — Dismutation and Oxidoreductions. *Biochem. Journ.*, t. **31**, 1937, p. 2327.

- (38) HOOGERHEIDE. — Bijdrage tot de kennis van de reactie van Pasteur. *Thèse de doctorat*. Delf, 1935.

— Contribution à l'étude de la réaction Pasteur. *Ann. des Ferm.*, t. **1**, 1935, p. 385.

- (39) SIMON (E.). — Beobachtungen über Gärungshemmung durch Halogenverbindungen. *Biochem. Zeit.*, t. **253**, 1932, p. 218.

- (40) CAYROL (P.). — Action de divers dérivés halogénés sur la fermentation alcoolique. *C. R. Ac. Sciences*, t. **193**, 1931, p. 446.

- (41) BERSIN. — Über die Beschleunigung der Autoxydation von Mercaptoverbindungen durch organische Katalysatoren, Ein Beitrag zur Erklärung der Wirkung von Jodessigsäure auf Glycolyse. *Biochem. Zeit.*, t. **248**, 1932, p. 3.

- (42) HELLSTRÖM (N.). — Das Reaktionsvermögen der Mercaptidogruppe. *Zeit. f. Physikal. Chem.*, A, t. **157**, 1931, p. 242 et t. **163**, 1933, p. 33.

- (43) BARRENSCHEEN et BENESCHOVSKY (H.). — Die Rolle der Sulfhydrylverbindungen im Kohlenhydrat-Abbau. *Biochem. Zeit.*, t. **255**, 1932, p. 453.

- (44) LOHMANN (K.). — Beitrag zur enzymatischen Umwandlung von synthetischem Methylglyoxal in Milchsäure. *Biochem. Zeit.*, t. **254**, 1932, p. 332.

- (45) LOHMANN (K.). — Untersuchungen über die chemische Natur des Coferments der Milchsäurebildung. *Biochem. Zeit.*, t. **237**, 1931, p. 445.
- (46) DICKENS (F.). — Interaction of Halogenacetates and SH compounds. *Biochem Journ.*, t. **27**, 1933, p. 1141.
— Iodacetic Acid, Glutathione and Tissue Glyoxalase. *Nature*, t. **131**, 1933, p. 130.
- (47) GIRSAVICIUS (J.-O.). — Some properties of the enzyme glyoxalase. II. pH activity curve with phenylglyoxal and the effect of glutathione. *Biochem. Journ.*, t. **27**, 1933, p. 537.
- (48) PLATT (M.-E.). et SCHROEDER (E.-F.). — Glyoxalase. The applicability of the manometric method to the study of glyoxalase. *Journ. Biol. Chem.*, t. **104**, 1934, p. 281.
- (49) JOWETT et QUASTEL. — The Glyoxalase activity of the red blood cell. The function of glutathione. *Biochem. Journ.*, t. **27**, 1933, p. 486.
- SCHUBERT (M.). — Combinaison of thiol acids with methylglyoxal. *Journ. Biol. Chem.*, t. **111**, 1935, p. 671.
- (50) QUASTEL (J.). — The Glutathione, Iodacetic acid and Glucose Metabolism. *Nature*, t. **131**, 1933, p. 206.
- (51) RAPKINE (L.). — Sur l'action de l'acide iodacétique sur le glutathion et la cystéine. *C. R. Soc. de Biol.*, t. **112**, 1933, p. 790 et 1294.
- (52) RAPKINE (L.). — Sur les processus chimiques au cours de la division cellulaire. Nature et cinétique de la réaction entre les groupements -SH et l'acide monoiodacétique. *J. Chim. Physique*, t. **33**, 1936, p. 493.
- (53) RAPKINE (L.). — Sur les processus chimiques au cours de la division cellulaire. *Ann. Physiol. et Physico.-Chim., Biol.*, t. **7**, 1931, p. 382.
- (54) RAPKINE (L.). — Sur les processus chimiques au cours

- de la division cellulaire. III Inhibition et rétablissement de la division cellulaire. *J. Chim. Physique*, t. **34**, 1937, p. 416.
- (55) GENEVOIS (L.) et CAYROL (P.). — Action de la cystéine sur la fermentation alcoolique en présence de facteur Z ou d'acide acétique halogéné. *C. R. Soc. Biol.*, t. **111**, 1932, p. 180.
- (56) SCHROEDER, WOODWARD et PLATT. — The relation of sulfhydryl to inhibition of yeast fermentation by iodoacetic acid. *Journ. of Biol. Chem.*, t. **101**, 1933, p. 133.
- (57) MEYERHOF (O.) et KIESSLING (W.). — Über den Hauptweg der Milchsäurebildung der Muskulatur. *Biochem. Zeit.*, t. **283**, 1936, p. 83.
- (58) MEYERHOF (O.). — Ueber die enzymatische Milchsäurebildung im Muskel. III. Die Milchsäurebildung aus den gärfähigen Hexosen. *Biochem. Zeit.*, t. **183**, 1927, p. 176.
- (59) GADDIE (R.) et STEWART (P.-C.). — The role of glutathione in muscle glycolysis. *Biochem. Journ.*, t. **29**, 1936, p. 2101.
- (60) SMYTHE. — The Reaction of Iodacetate and of Iodoacetamide with various sulfhydryl groups with urease and with yeast preparations. *Journ. of Biol. Chem.*, t. **114**, 1936, p. 601.
- (61) LOHMANN. — Ueber die Monojodessigsäurevergiftung des milchsäurebildenden Ferments und der Methylglyoxalase. *Biochem. Zeit.*, t. **262**, 1933, p. 152.
- (62) NEUBERG (C.) et KOBEL (M.). — Kleinere Mitteilungen verschiedenen Inhalts. *Biochem. Zeit.*, t. **238**, 1931, p. 226 et III. Fehlerquelle bei Verwendung von Jodessigsäure als gärungshemmenden Agents. *Ibidem*, p. 239.
- (63) MICHAELIS (L.) et SCHUBERT (M.). — The reaction of

iodacetic acid on mercaptans and amines. *Journ. Biol. Chem.*, t. **106**, 1934, p. 331.

SCHUBERT (M.). — The Interaction of Iodacetic acid and Tertiary amines. *Journ. Biol. Chem.*, t. **116**, 1936, p. 437.

(64) ZUCKERKANDL (F.) et MESSINER-KLEBERMASS (L.). — Ueber die Einwirkung bildender Substanzen auf den Zuckerabbau durch Hefe. *Biochem. Zeit.*, t. **239**, 1931, p. 172.

(65) SCHROEDER, WOODWARD et PLATT. — The effect of amines on yeast poisoned by iodocetic acid. *J. of Biol. Chem.*, t. **100**, 1933, p. 525.

(66) HOPKINS (F.). — On an autoxidisable constituent of the cell. *Biochem. Journ.*, t. **15**, 1921, p. 286.

(67) HOPKINS (F.). — On Glutathione : A Reinvestigation. *Journ. of Biol. Chem.*, t. **84**, 1929, p. 269 et 320.

(68) NICOLET (B.). — The structure of glutathione. *Journ. Biol. Chem.*, t. **88**, 1930, p. 389.

(69) HARRINGTON (C.), MEAD (T.). — Synthesis of glutathione. *Biochem. Journ.*, t. **29**, 1935, p. 1602.

(70) WARBURG (O.) et SAKUMA (T.). — Ueber die sogenannte Autoxydation des Cysteins. *Pflüg. Arch.*, t. **200**, 1923, p. 203.

(71) HARRISON (D.-C.). — The Catalytic action of traces of iron and copper on the anaerobic oxidation of sulphhydryl compounds. *Biochem. Journ.*, t. **21**, 1927, p. 335.

(72) MELDRUM (N.) et DIXON (M.). — The properties of pure glutathione. *Biochem. Journ.*, t. **24**, 1930, p. 472.

(73) DIXON (M.) et TUNNICLIFFE (H.-E.). — The oxidation of reduced glutathione and other sulphhydryl compounds. *Proc. Roy. Soc., B.*, t. **94**, 1923, p. 266.

(74) MICHAELIS et BARRON. — Oxidation-reduction systems

- of biological significance. Comparative study of the complexe of cystein with the metals of iron groups. *Journ. Biol. Chem.*, t. 83, 1929, p. 191.
- (75) BINET (L.) et WELLER (G.). Le Glutathion. *Actualités scientifiques et industrielles*, 1937. Hermann et Cie, Paris.
- (76) HOPKINS (F.) et DIXON (M.). — On glutathione II. A thermostable oxidation-reduction system. *Journ. Biol. Chem.*, t. 54, 1922, p. 527.
- (77) HOPKINS (F.). — Glutathione. Its Influence in the oxydation of fats and proteins. *Biochem. Journ.*, t. 19, 1925, p. 787.
- (78) HOPKINS (F.), ELLIOT (P.-R.-S.) et ELLIOT (K.-A.-C.). — The relation of glutathione to cell respiration with special reference to hepatic tissue. *Proc. Roy. Soc. B.*, t. 109, 1932, p. 58.
- (79) MANN (Ph.). — The reduction of glutathione by the liver system. *Biochem. Journ.*, t. 26, 1932, p. 785.
- (80) MELDRUM (N.). — The reduction of glutathione in mammalian erythrocytes. *Biochem. Journ.*, t. 26, 1932, p. 817.
- (81) MELDRUM (N.) et TARR (H.). — The reduction of glutathione by the Wargurg-Christian system. *Biochem. Journ.*, t. 29, 1935, p. 108.
- (82) OGSTON (F.-J.) et GREEN (D.-E.). — The mechanism of the reaction of substrates with molecular oxygen. *Biochem. Journ.*, t. 29, 1935, p. 1983.
- (83) RAPKINE (L.). — Sulfhydryl groups and enzymic oxidation-reduction. *Biochem. Journ.*, t. 32, 1938, p. 1729.
- (84) SCHOEN (M.). — Faits nouveaux et nouvelles hypothèses dans la chimie des fermentations. *Ann. des Ferm.*, t. 4, 1938, p. 273.
- (85) EULER (H. v.), ADLER (E.) et HELLSTRÖM (H.). — Ueber

die Komponenten der Dehydrasesysteme. Mechanism der Dehydrierung von Alkohol und Triosephosphaten und der Oxydoreduction. *Zeit. f. Physiol. Chem.*, t. 241, 1936, p. 239.

EULER (H. v.), ADLER (E.), GÜNTHER (G.) et HELLS-TRÖM (H.). — Co-zymase, das wasserstoffübertragende Co-Enzym bei der Muskel-Glykolyse. *Zeit. f. Physiol. Chem.*, t. 245, 1937, p. 217.

(86) WARBURG (O.), CHRISTIAN (W.) et GRIESE (A.). — Co-Dehydrase II. Wasserstoffübertragendes Co-Ferment, seine Zusammensetzung und wirkungsweise. *Biochem. Zeit.*, t. 282, 1935, p. 157.

WARBURG (O.), CHRISTIAN (W.) et KARRER (P.). — Pyridin der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten. *Ibidem*, t. 287, 1936, p. 291.

EULER (H. v.), SCHLENK (F.). — Co-zymase. *Z. f. Physiol. Chem.*, t. 246, 1937, p. 64.

(87) WARBURG (O.) et CHRISTIAN (W.). — Ueber ein neues Oxydationsferment und sein Absorptionsspektrum. *Biochem. Zeit.*, t. 254, 1932, p. 438.

(88) BIGWOOD (E.-J.). — Le mécanisme de la respiration cellulaire en aérobiose et en anaérobiose. Masson, Paris, 1935, p. 51.

(89) WALDSCHMIDT-LEITZ et PURR (A.). — Ueber Zookinase. *Zeit. Physiol. Chem.*, t. 198, 1931, p. 260.

WALDSCHMIDT-LEITZ, BALLS (A.-K.) et PURR (A.). — *Naturwiss.*, t. 18, 1930, p. 644.

(90) BERSIN (T.). — Thiolverbindungen und Enzyme. *Ergebn. Enzymforsch.*, t. 4, 1935, p. 68.

(91) QUASTEL et WHEATLEY. — The relation of thiol Compounds to glucose fermentation. *Biochem. Journ.*, t. 26, 1932, p. 2169.

- (92) BUMM (E.) et APPEL (H.). — Ueber die Wirkung von Glutathion auf die Pasteursche Reaktion. *Zeit. f. Physiol. Chem.*, t. **210**, 1932, p. 79.
- (93) BAKER (Z.). — Glutathione and the Pasteur-Reaction. *Biochem. Journ.*, t. **131**, 1937, p. 980.
- (94) AUHAGEN (E.) et NEUBERG. — Ueber Umschaltung der alkoholischen Zuckerspaltung durch Hefe in Milchsäuregärung. *Biochem. Zeit.*, t. **264**, 1933, p. 452.
AUHAGEN (E.) et AUHAGEN (T.). — *Ibidem*, t. **268**, 1934, p. 247.
- (95) DIXON (M.) et QUASTEL (J.-H.). — A new type of Reduction-Oxidation System. Part. I. Systeine and Glutathione. *J. of Chem. Society*, t. **123**, 1923, p. 2943.
- (96) QUASTEL (J.-H.) et STEPHENSON (M.). — Experiments on « strict » anaerobies. I. Relation of B. sporogenes to oxygen. *Biochem. Journ.*, t. **20**, 1926, p. 1126.
CHAIX (P.) et FROMAGEOT (Cl.). — Action de quelques dérivés sulfurés sur la fermentation du glucose par les bactéries propioniques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, t. **18**, 1936, p. 1436.
— Sur la nécessité de substances sulfurées pour la réalisation de la glycolyse bactérienne. *Enzymologia*, t. **1**, 1937, p. 321.
— Voir aussi : *C. R. Ac. Sciences*, t. **202**, 1936, p. 983.
- (97) JELINEK (B.). — Etudes sérologiques sur les levures. *Ann. des Ferment.*, t. **4**, 1938, p. 1.
- (98) WEBER (A.-Ph.). — Influences des Hormones cristallisées sur la croissance de certaines espèces de levures. *Thèse de doctorat*, Paris, 1936.
- (99) MEUNIER (P.). — L'électrophotométrie pratique en chi-

- mie biologique. *Ann. des Ferm.*, t. 2, 1936, p. 278 et *Bull. Soc. Chim. Biol.*, t. 19, 1937, p. 113.
- (100) MILATZ (J.-M.-W.) et ROTTIER (P.-B.) — A new nephelometer and its application in microbiological nephelometry. *Zentralbl. f. Bakt. Parasiten. und Infektionskrank.*, t. 94, 1937, p. 227.
- (101) FAGUET (M.). — Courbes spécifiques de croissances microbienne enregistrées par photométrie. *Ann. des Ferm.*, t. 1, 1935, p. 348.
- (102) FINK (H.). — Beiträge zur Methylenblaufärbung der Hefezellen und Studien über die Permeabilität der Hefezellmembran. *Zeit. f. Physiol. Chem.*, t. 195, 1931, p. 215.
- (103) WARBURG (O.). — Ueber die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen. *Biochem. Zeit.*, t. 100, 1919, p. 230.
- WARBURG (O.). — Versuche an überlebenden Carcinomgewebe. *Biochem. Zeit.*, t. 142, 1923, p. 317.
- WARBURG (O.). — Verbesserte Methode zur Messungen der Atmung. *Biochem. Zeit.*, t. 152, 1924, p. 51.
- (104) DIXON (M.). — Manometric. *Methods*, 1934.
- (105) WARBURG (O.). — Verbesserte Methode zur Messungen der Atmung. *Biochem. Zeit.*, t. 152, 1924, p. 51.
- (106) BERTRAND (G.). — Dosage des sucres réducteurs. *Bull. Soc. Pharmac.*, t. 14, 1907, p. 7.
- (107) MARTINI (M.) et NOURRISSON (A.). — Méthode chimique du dosage de l'alcool. *Ann. des Fals. et des Fraudes*, 1925, p. 235.
- (108) DENIGES et CHELLE. — Modification à la technique de la recherche et du dosage du brome ionisé par le réactif fuschiné sulfurique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1917, p. 75.
- CHELLE (L.) et VITTE. — L'acide monobromacétique et

- le brome normal des vins. *Ann. des Fals. et Fraudes*, t. 29, 1936, p. 98.
- (109) FLORENTIN et MUNSCH. — Sur la recherche des antiseptiques bromés dans les matières alimentaires. *Ann. des Fals. et Fraudes*, t. 29, 1936, p. 104.
- (110) DAMIENS. — Sur le brome existant normalement dans les tissus. *Bull. des Sc. Pharmac.*, t. 27, 1920, p. 609 et t. 28, 1921, p. 37, p. 85 et 205.
- (111) HAHN (Fr.). — Die Bestimmung von kleinsten Mengen Bromid neben sehr grossen Chloridüberschüsse. *Zeit. für ang. Chem.*, t. 43, 1930, p. 993 et *Mikrochemie*, t. 17, 1935, p. 222 (229).
- (112) CHARPENTIER. — *Bull. Soc. Ing. Civils*.
 VOLHARD (J.). — Ueber eine neue Methode der massanalytischen Bestimmung des Silbers. *J. der Prakt. Chemie*, t. 9, 1874, p. 217.
 Voici la référence trouvée dans *Éléments de Volumétrie*, 1930, p. 252 (Institut Chimique de Nancy).
 Cette méthode est souvent attribuée à tort à Volhard. Celui-ci l'avait publiée dans le *J. Pr. Ch.*, tandis que Charpentier avait donné le premier tous les détails relatifs au dosage du fer, des alcalis minéraux et de l'argent par les sulfocyanures alcalins 4 ans auparavant dans le *Bull. Soc. Ing. Civ.*. Charpentier a d'ailleurs inséré dans ce bulletin une réclamation de priorité en 1884.
- (113) LAUDAT (M.). — Le dosage du chlore dans le sérum sanguin et dans les liquides albumineux de l'organisme. *Journ. de Pharmacie et de Chimie*, t. 16, 1917, p. 168.
- (114) MAC LEAN (Fr.) et VAN SLIKE. — A method for the titration of small amounts of halides. *Journ. of Americ. Chem. Soc.*, t. 37, 1915.
- (115) FOSTER (G.-L.). — A modification of Mac Lean-Van

- Slike method fort the determination of chlorides in blood. *Journ. Biol. Chem.*, t. **31**, 1917, p. 483.
- (116) MEILLERE (G.) et DE SAINT-RAT. — Dosage de l'azote total. Dispositif pour recueillir l'ammoniaque. Applications au dosage des albumines du lait. *Journ. Pharm. et Chim.*, (septième série), t. **25**, 1922, p. 100.
- (117) BINET (L.) et WELLER (G.). — Le dosage du glutathion réduit dans les tissus. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, t. **16**, 1934, p. 1284.
- Le dosage du glutathion total dans les tissus. *Ibidem*, t. **18**, 1936, p. 358.
- (118) MAUTHNER (J.). — Über Cystin. *Zeit. für Physiol. Chem.*, t. **78**, 1912, p. 28.
- (119) BINET (L.) et WELLER (G.). — Quelques addendas à notre méthode du microdosage du glutathion dans les tissus. *Bull. Soc. Ch. Biol.*, t. **20**, 1938, p. 123.
- (120) LEBEDEFF (A.). — Extraction de la zymase par simple macération. *Ann. Inst. Pasteur*, t. **26**, 1912, p. 8.
- (121) NILSSON (R.) et FRITHIOF (Alm.). — Ueber die Loslösung des Zymasesystems aus der Hefezelle durch Autolyse. *Zeit. Physiol. Chem.*, t. **239**, 1936, p. 179.
- (122) RICHET (C.). — Adaptation des microbes (Ferments lactiques) au milieu. *Ann. Inst. Pasteur*, t. **31**, 1917, p. 51.
- (123) CLARK. — The determinatoin of Hydrogen Ions, 1928. Sörensen's phosphate mixtures, p. 203 et 210.
- (124) MEYERHOF (O.). — Ueber den Einfluss des Sauerstoffs auf die alkoholische Gärung der Hefe. *Biochem. Zeit.*, t. **162**, 1925, p. 43.
- (125) HAAG (E.) et BOLOMEY (P.). — Relation entre le glutathion et l'action inhibitrice de l'acide monoiodacétique dans la fermentation alcoolique. *C. R. Soc. Biol.*, t. **130**,

1939, p. 217; *in extenso* dans *Ann. des Ferm.*, t. 5, 1939, p. 45.

- (126) HARDEN (A.), THOMPSON (J.) et YOUNG (W.-Y.). — Apparatus for collecting and measuring the gases evolved during fermentation. *Biochem. Journ.*, t. 5, 1911, p. 230.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	11
PREMIERE PARTIE. — REVUE DES TRAVAUX ANTERIEURS	13
I) ANTISEPTIQUES ET ACCOUTUMANCE	13
II) ACTION DES ACIDES ACÉTIQUES MONO- HALOGÉNÉS SUR LA DEGRADATION GLU- CIDIQUE	17
III) LE GLUTATHION : QUELQUES PROPRIÉ- TES PHYSIOLOGIQUES GÉNÉRALES	33
DEUXIEME PARTIE. — METHODES ANALY- TIQUES	41
TROISIEME PARTIE. — RECHERCHES PERSON- NELLES	61
CHAP. I ACCOUTUMANCE DES LEVURES AUX ACIDES ACÉTIQUES MONOHALOGÉ- NÉS	61
CHAP. II ESSAIS DE FERMENTATION. ME- SURE DU POUVOIR RESPIRATOIRE ET DU POUVOIR FERMENT	69

CHAP. III VARIATION DU TAUX DE GLUTATHION DES LEVURES, SOUS L'INFLUENCE DES ACIDES MONOHALOGÉNÉS	80
CHAP. IV RELATION ENTRE LE POUVOIR INHIBITEUR DE L'ACIDE MONOCHLORACETIQUE ET LA FRACTION DE CET ACIDE COMBINÉ AU GLUTATHION DE LA LEVURE	90
CHAP. V LEVURES VIVANTES : FERMENTATION INHIBÉE PAR L'ACIDE MONOIODACETIQUE. ESSAIS DE REACTIVATION PAR LE GLUTATHION	98
CHAP. VI SUC DE LEVURE LEBEDEFF : FERMENTATION INHIBÉE PAR L'ACIDE MONOIODACETIQUE. ESSAIS DE REACTIVATION PAR LE GLUTATHION	107
RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES	121
BIBLIOGRAPHIE	127

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

*Les rapports entre la respiration
et la désintégration zymasique des glucides*

Vu et approuvé :

Paris, le 27 Avril 1939

Le doyen de la Faculté des Sciences,

Ch. MAURAIN

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris

G. ROUSSY.

